

**STRAHLENINDUZIERTE
CHROMOSOMENABERRATIONEN
IN DEN LYMPHOZYTEN
VERSCHIEDENER SÄUGERSPEZIES
UND DER EINFLUSS VON KOFFEIN
WÄHREND DER G2-PHASE**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem
Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von
Diplom-Biologe
Martin Rosenthal
aus Niederschelden in Westfalen

1983





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546605_0029

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

STRAHLENINDUZIERTE CHROMOSOMENABERRATIONEN
IN DEN LYMPHOZYTEN
VERSCHIEDENER SÄUGERSPEZIES
UND DER EINFLUSS VON KOFFEIN WÄHREND DER G2-PHASE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem
Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von
Diplom-Biologe
Martin Rosenthal
aus Niederschelden in Westfalen

erster Referent : Herr Prof. Dr. G. Obe

zweiter Referent : Frau Prof. Dr. G. Linnert

Tag der Promotion: 4. Juli 1983

I N H A L T

1. EINLEITUNG	4
2. MATERIAL und METHODEN	18
3. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	30
4. QUALITATIVE VERSUCHSERGEBNISSE	37
5. QUANTITATIVE VERSUCHSERGEBNISSE	62
6. DISKUSSION	214
7. ZUSAMMENFASSUNG	231
LITERATURVERZEICHNIS	234
ABSCHLUSSBEMERKUNG	246
LEBENS LAUF	247

1. EINLEITUNG

Als Trägerin der Erbinformation zeichnet sich die DNS zum einen dadurch aus, daß sie die Fähigkeit zur semi-konservativen Reduplikation besitzt [Taylor, 1957; Delbrück und Stent, 1957; Meselson und Stahl, 1958].

Diese Fähigkeit muß als die notwendige Voraussetzung für die Weitergabe der genetischen Information an folgende Generationen von Organismen und damit für die Erhaltung des Lebens angesehen werden. Zum anderen besitzt die DNS, neben dieser konservativen noch eine progressive Funktion, welche die Veränderbarkeit der Erbinformation spontan und durch äußere Einflüsse erlaubt und damit als Grundlage für die Evolution des Lebens gelten kann. Diese Funktionen werden durch die chemische Struktur der DNS [Watson und Crick 1953] und die Mechanismen ihrer Biosynthese ermöglicht [Stent, 1971; Davidson, 1972; Lewin, 1974a, -b, -c; Kornberg, 1974a; Edenberg und Huberman, 1975; Gefter, 1975].

Als Polymerisationsprodukt einzelner Nukleotide und aufgrund der Determination der genetischen Information durch die Sequenz der vier Basen, Adenin, Guanin Cytosin und Thymin, gestattet die DNS eukaryoter Zellen eine nahezu beliebige Variation ihres Informationsmusters.

Veränderungen dieses, in einem Organismus einmal festgelegten Informationsmusters werden als Mutationen [de Vries, 1901] bezeichnet. Sie können das einzelne Gen, ein Chromosom oder das gesamte Genom betreffen.

Genmutationen stellen qualitative Veränderungen der Erbinformation innerhalb eines Gens dar. Sie können durch den chemischen Umbau einzelner Nukleinsäurebasen, durch die Substitution einer Base mit einer anderen oder einem Basenanalogen, sowie durch Deletion und Insertion (Verschieben) einzelner oder mehrerer Basenpaare hervorgerufen werden [Benzer, 1957; Freese, 1959; Benzer, 1961; Nomura und Benzer, 1961; Watson, 1965; Drake, 1970] und können zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz in Proteinen und Enzymen führen [Wolstenholme, 1969].

Chromosomenmutationen können sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Veränderung der Erbinformation bedeuten und sind stets eine Folge von DNS-Brüchen. Die Erbinformation qualitativ verändernde Chromosomenmutationen beeinflussen, allein aufgrund einer Translokation ansonsten unveränderter Gene oder Gengruppen, das Zusammenwirken der genetischen Funktionsabläufe innerhalb eines Organismus [Sturtevant, 1925; Hannah, 1951; Becker, 1961; Lima-de-Faria, 1976a, -b].

Eine quantitative Änderung der genetischer Information kann bei Chromosomenmutationen durch Deletion und Duplikation, aber auch durch Translokation einzelner Chromosomenabschnitte verursacht werden [Bridges, 1919; Painter und Muller, 1929; Rieger und Michaelis, 1967].

Genommutationen bedeuten immer eine quantitative Änderung des DNS-Gehaltes und werden durch die Störung zellphysiologischer Mechanismen (Fehlen oder Mißbildung der Spindel) hervorgerufen. Dabei kommt es durch das Fehlen oder die Verdoppelung einzelner



Chromosomen als Folge der Nicht-Verteilung der Schwesterchromatiden auf die Tochterzellen (mitotisches "non-disjunction") [Bridges, 1913] zur Aneuploidie [Täckholm, 1922; Dyer et al., 1970] und durch die Vervielfachung eines ganzen Chromosomensatzes zur Polyploidie [Strasburger, 1910, Winkler, 1916].

Die Verminderung oder Vermehrung genetischer Information resultiert jedoch stets in einer Änderung der Gendosis, wodurch im tierischen Organismus erhebliche Störungen des biologischen Gleichgewichts verursacht werden, welche fast immer Letalität zur Folge haben [Rieger, 1963].

Die Chromosomenmutation und die Genommutation gehören zu den, in eukaryoten Zellen zytologisch erfaßbaren Mutationsformen.

Genommutationen sind in der Metaphase der Mitose anhand der Abweichung der Chromosomenanzahl vom normalen, arteigenen Karyotyp zu erkennen. Als Chromosomenmutationen lassen sich alle strukturellen Veränderungen (Aberrationen) an den Metaphasechromosomen bezeichnen, die zum Verlust (Deletion), zur Verdopplung (Duplikation) oder zum Austausch (Translokation) von Chromosomensegmenten führen. Prinzipiell lassen sich drei Typen von Aberrationen, abhängig vom Zeitpunkt ihrer Entstehung vor oder nach der identischen Reduplikation der Chromosomen unterscheiden. In den Metaphasen sind dann Aberrationen des Chromosomen-Typs (pre-split aberrations) beziehungsweise des Chromatid- und des Subchromatid-Typs (post-split aberrations) zu beobachten. Sie können ein einzelnes Chromosom betreffen, also intrachromosomale Ereignisse darstellen, oder, wie es bei Translokationen der Fall ist, zwei oder mehr Chromosomen einbeziehen und zu interchromosomalen Aberrationen führen.

Aufgrund ihrer relativ leichten und sicheren Identifizierbarkeit sind Chromosomenaberrationen für die zytologische Analyse von besonderer Bedeutung. Sie treten spontan nur äußerst selten auf und können als ein Hinweis auf die genetische Belastung eines Organismus gewertet werden und als Maß für die mutagene Wirkung physikalischer oder chemischer Agenzien dienen.

Die Tatsache, daß Röntgenstrahlen Mutationen auslösen können, ist bereits seit langem bekannt [Muller, 1927; Altenburg, 1928; Stadler, 1928] und ist seit dieser Zeit an den verschiedensten biologischen Systemen bestätigt worden. Bereits die ersten Analysen strahleninduzierter Chromosomenaberrationen führten zu der Annahme, daß es sich bei ihrer Entstehung um einen fehlerhaften Reparaturvorgang handeln müsse [Stadler, 1932; Mather und Stone, 1933; Bauer, 1939; Sax, 1940; Bauer, 1942; Lea, 1947; Revell, 1955].

Aus neueren, biochemischen Untersuchungen ist bekannt, daß Röntgenstrahlen, aufgrund ihrer ionisierenden Wirkung und einer damit verbundenen Radikalbildung [Dertinger und Jung, 1969], Brüche in der DNS induzieren [Paterson et al., 1973; Lennartz et al., 1973], die zu 90 bis 95 % jeweils nur einen Strang der DNS-Doppelhelix (single-strand-break) betreffen [Van der Schans et al., 1973]. Der Rest von 5 bis 10 % stellt DNS-Doppelstrangbrüche (double-strand-break) dar [Freifelder, 1966; Corry und Cole, 1968; Veatch und Okada, 1969; Lennartz, 1973].

Als Voraussetzung für die Entstehung von Chromosomenaberrationen müssen nach der Bruch-Reunions-Hypothese [Sax, 1940, 1941] Brüche ganzer Chromosomen beziehungsweise Chromatiden angesehen

werden. Diesen können sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche der DNS zugrundeliegen, sofern letztere an benachbarten Nukleotidpaaren gegenüberliegender Stränge aufgetreten sind [Wolff, 1961; Evans, 1962; Bender et al., 1974]. Die überwiegende Mehrzahl dieser Brüche, etwa 90 bis 99 % [Rieger et al., 1976], wird innerhalb kürzester Zeit nach der Induktion durch korrekte Reparatur wiederhergestellt [Lehmann und Ormerodt, 1970; Setlow und Setlow, 1972; Howland et al., 1975]. Dieser Vorgang wird als Restitution bezeichnet. Die nicht reparierten Brüche manifestieren sich aufgrund der räumlichen Verlagerung der Bruchenden entweder in "offenen" Chromosomenaberrationen (terminalen Deletionen) oder sie "vereinigen" sich als Folge einer fehlerhaften Reparatur (misrepair) mit anderen Bruchenden und führen durch ihre Reunion zu Austauschaberrationen.

Die Reparatur strahleninduzierter Chromosomen- oder Chromatidbrüche, sei es durch Restitution oder durch Reunion basiert auf molekularer Ebene im wesentlichen auf dem System des "excision-repair" [Setlow und Carrier, 1964; Boyce und Howard Flanders, 1964; Lohman, 1968; Rupp et al., 1969]. Dieses System umfaßt folgende Schritte:

1. Auffinden und Erkennen der Bruchstelle (recognition),
2. Herausschneiden einiger, an die Bruchstelle angrenzender Nukleotide durch eine Exonuklease (excision),
3. Füllen der entstandenen Lücke durch Ersetzen der fehlenden Nukleotide (gap-filling), wobei der noch intakte, dieser Lücke gegenüberliegende Einzelstrang als komplementäres Muster für die DNS-Polymerase dient (repair-replication),
4. Verbinden der freien Enden durch DNS-Ligasen (rejoining).

Ist bei einem Bruch keine Beschädigung der unmittelbar an die Bruchstellen angrenzenden Nukleotide eingetreten, so kann eine Reparatur auch einfach nur durch "rejoining" erfolgen.

Weil sich genetische Experimente am Menschen aus humanen und ethischen Gründen verbieten, ist die Extrapolation tierexperimentell erhobener Befunde auf den Menschen von herausragender Bedeutung.

Wie bereits erwähnt, sind Chromosomenaberrationen ein Maß für die mutagene Wirkung eines Agens, und damit auch der Röntgenstrahlen. Die Häufigkeit ihres Auftretens läßt somit eine Aussage über die Strahlenempfindlichkeit einer Population von Organismen oder Zellen zu.

Die Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit beschränkt sich beim Menschen auf die zytologische Analyse chromosomaler Aberrationen [Kelly und Brown, 1965]. Hierfür bietet sich das Lymphozyten-Test-System an [Dolphin und Purrott, 1971; Evans und O'Riordan, 1975; Obe et al., 1976a; Beek und Obe, 1977; Beek, 1977; Bauchinger, 1978;], da es relativ gut reproduzierbare Untersuchungsergebnisse liefert und in seinen Parametern hinreichend bekannt ist [Bender und Prescott, 1962; Dudin et al., 1974, 1976; Obe et al., 1975; Obe et al. 1976b]. Es läßt sich, wie aus einer Vielzahl von Arbeiten hervorgeht, außer für menschliche Lymphozyten noch für die, einer Reihe weiterer Säugerspezies einsetzen und bildet deshalb auch die experimentelle Grundlage der vorliegenden Untersuchung.

Für die in verschiedenen Untersuchungen gefundenen Unterschiede sind in Bezug auf die Raten chromosomaler Aberrationen eine Reihe von Faktoren diskutiert worden, die die Strahlenempfindlichkeit beeinflussen können.

Als variable Faktoren sind im weitesten Sinne alle, durch die experimentelle Handhabung beeinflussbaren Parameter anzusehen. Dazu gehören in erster Linie die Kulturdauer [Steffen und Michalowski, 1973; Buckton und Pike, 1964; Bender und Brewen, 1969;], die Sauerstoffkonzentration und die Temperatur bei der Bestrahlung [Bajerska und Liniecki, 1969; Liniecki et al., 1973], die Strahlenqualität [Barendsen, 1979], sowie das zur Stimulierung der Lymphozyten verwendete Mitogen [Deknudd und Léonard, 1977].

Als den Zellen immanente Faktoren sind zum Beispiel die in menschlichen Lymphozyten vermuteten [Bender und Brewen 1969; Steffen und Michalowski, 1973] und nachgewiesenen Subpopulationen [Beek und Obe, 1976; Beek und Obe, 1977; Beek, 1977] zu nennen. Ferner können zelluläre Parameter, wie der DNS-Gehalt, das Kernvolumen und die Struktur der Chromosomen [Griffin et al., 1970; Léonard und Gerber, 1978; Sasaki et al., 1970; Natarajan und Gropp, 1972], sowie Geschlecht und Alter eines Spenders (Tier oder Mensch) [McFee et al., 1970; Deknudd und Léonard, 1977; Bender und Brewen, 1969; Bochkov und Pilosov, 1978] die Aberrationsraten beeinflussen. Als besonders bedeutsame, dem jeweiligen Zellsystem immanente Faktoren gelten jedoch, und darin stimmt die Mehrzahl der Autoren überein, die während der Dauer des Zellzyklus zur Verfügung stehende Reparaturzeit und die Effektivität der Reparatursysteme der Zellen.

Ein konstanter, die dosisabhängigen Raten chromosomaler Aberrationen bestimmender Faktor wurde 1973 von Brewen et al. postuliert. Dabei bezogen sich die Autoren auf die nach Bestrahlung der Lymphozyten des peripheren Blutes verschiedener Säugetiere (Maus, Chinesischer Hamster, Ziege, Schaf, Schwein und Rattenkänguruh) und des Menschen aufgetretenen Raten dizentrischer Chromosomen und stellten bei der vergleichenden Analyse ihrer Ergebnisse eine lineare Abhängigkeit dieser Aberrationsraten von der Anzahl der Chromosomenarme der verschiedenen Karyotypen fest. Diese sogenannte "arm number"-Hypothese (ANH) konnten Brewen und Preston [1973a, -b] durch ihre Untersuchungen der strahleninduzierten chromosomalen Austausche in den Spermato gonien der Maus, des Chinesischen Hamsters und des Menschen, bestätigen, und sie leiteten daraus einen Extrapolationsfaktor für die Strahlenempfindlichkeit somatischer Zellen auf Keimzellen ab. Damit stellte die ANH eine ideale Möglichkeit für die Extrapolation tierexperimenteller Befunde auf den Menschen dar. Scott und Bigger [1974] konnten jedoch die ANH aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse nur für das Rattenkänguruh bestätigen. Beim Vergleich der dosisabhängigen Raten dizentrischer Chromosomen wiesen sie in menschlichen Lymphozyten eine etwa doppelt so hohe Strahlenempfindlichkeit wie in Kaninchenlymphozyten nach, obwohl die Zahlen der Chromosomenarme fast die gleiche ist (Kaninchen: 80, Mensch: 81).

Muramatsu und Matsuoka [1975] konnten zeigen, daß die relative Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten von Affen (*Macaca fascicularis*), Hunden und Katzen ebenfalls nicht mit der Anzahl der Chromosomenarme korreliert ist.

In der Übersichtsarbeit von Sankaranarayanan (1976) wird hervorgehoben, daß auch eine Reihe anderer Erkenntnisse nicht mit der ANH übereinstimmen und daß die ANH in Bezug auf die Determinierung genetischer Risiken durch ionisierende Strahlen, doch noch sehr fragwürdig ist und einer weiteren Überprüfung bedarf. Die in diesem Zusammenhang von Léonard et al. [1976, 1977a, -b] am Schwein, dem Schaf, der Ziege und der Kuh, dem Schimpansen und dem Kaninchen vorgenommenen Untersuchungen lieferten ebenfalls keinerlei Hinweise für die Richtigkeit der ANH, sondern führten zu der Ansicht, daß die Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit von Spezies mit annähernd gleicher Anzahl an Chromosomenarmen durch Unterschiede in der Reparatureffektivität bedingt sein könnten.

Die Methoden der BrdU-Markierung und differentiellen Färbung der Metaphasechromosomen aufeinanderfolgender Mitosen [Perry und Wolff, 1974; Korenberg und Freedlender, 1974], gestatteten die routinemäßige Auswertung ausschließlich erster Metaphasen. Sie leiteten eine gezieltere Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit von verschiedenen Spezeies unter dem Gesichtspunkt der Zellkinetik ein, und sie erlauben darüberhinaus eine genauere Betrachtung früherer und ohne Anwendung dieser Methoden erarbeiteter Forschungsergebnisse, sowie deren Überprüfung [De Boer et al., 1977; Léonard und Gerber, 1978; Stephan et al., 1979; Fabry und Léonard, 1979; Bianchi et al., 1979; Léonard und Decat, 1979; Léonard et al., 1979; van Buul et al., 1980; Wyszynska und Liniecki, 1980; Decat et al., 1980; Modave et al., 1981; Debuyst et al., 1982;].

Diese Untersuchungen erbrachten neben einer Vielzahl neuer Informationen Ergebnisse, die zum Teil eine Beeinflussung der Aberrationsraten durch die zuvor erwähnten, variablen und zellimmanenten Faktoren bestätigen. Diese Informationen und Befunde zusammenfassend, gelangen Léonard et al. [1982] zu dem Schluß, daß es zwischen der relativen Strahlenempfindlichkeit verschiedener Spezies und der "arm number"-Hypothese keine Beziehung gibt.

Wie schon erläutert, spielen Reparatursysteme in der Zelle eine wesentliche Rolle bei der Entstehung chromosomaler Austauschaberrationen und sind deshalb als ein, die relative Strahlenempfindlichkeit beeinflussender Faktor anzusehen. Die Effektivität, sowie die für die Reparatur zur Verfügung stehende Zeit bestimmen die Kapazität der Reparatursysteme in der Zelle. Eine Veränderung der Effektivität [Léonard et al. [1977b] und/oder der Zeit [Wyszynska und Liniecki, 1980] durch von außen auf die Zelle wirkende Einflüsse kann sich demnach auf die Raten strahleninduzierter Aberrationen auswirken.

Das Verhältnis der Zahl identifizierbarer Chromosomen- oder Chromatidbrüche zur Anzahl der an Translokationen beteiligten Brüche stellt den "Reunionskoeffizienten" dar [Darlington und Upcott, 1941]. Kehrt man dieses Relation um und setzt die Raten der an Translokationen (misrepair) beteiligten Brüche ins Verhältnis zu den Raten offener Brüche (nonrepair), dann läßt sich daraus die "relative Reparatur" in Form eines "Reunionsfaktors" bestimmen.

Beeinflußt man nun die Reparaturkapazität gezielt und auf eine definierbare Weise, dann kann man eine Beziehung zwischen der beeinflussten und unbeeinflussten, relativen Reparatur aufstellen, die es gestattet, die Reparaturkapazitäten in den Zellen verschiedener Spezies miteinander zu vergleichen.

Diese Überlegung stellt die methodische Grundlage der vorliegenden Arbeit dar.

Aufgrund der Fülle, von Kihlman in seinem Buch "Caffeine and Chromosomes" [1977] dargelegter Zusammenhänge über die Wirkungen, die Koffein innerhalb von Organismen und in Zellen haben kann lag es nahe, diese Substanz, das 1,3,7-Trimethylxanthin, als definiertes, die Reparatur von strahleninduzierten Schädigungen an der DNS und an Chromosomen beeinflussendes Agens zu verwenden.

Die Wechselwirkungen zwischen Koffein und der DNS wird in zahlreichen Arbeiten angesprochen.

Genetische Experimente an der Maus führten zu kontroversen Ansichten. Nach Koffeinbehandlung männlicher Tiere konnten im spezifischen Lokus-Test [Lyon et al., 1962] keine Effekte nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse konnten im dominanten Letal-Test [Lyon et al., 1962; Adler, 1969; Röhrborn, 1972] bestätigt werden. In anderen Untersuchungen wurde Koffein jedoch für die beobachtete, erhöhte Letalität verantwortlich gemacht [Kuhlmann et al., 1968; Epstein et al., 1970]. Kihlman [1977] ist allerdings der Ansicht, daß eine genetische Wirkung in Form vererbbarer Mutationen nicht besteht.

In Bakterien und Schimmelpilzen konnte eine Beeinträchtigung der Reparatursynthese (unscheduled DNA synthesis) nachgewiesen werden [Bendigkei und Hanawalt, 1968; McCormick et al., 1972; Harris, 1973]. Aufgrund biochemischer Untersuchungen wird vom Koffein vermutet, daß es mit der DNS-Doppelhelix interkaliert, indem es sich in die Lücken zwischen den Wasserstoffbrücken der Basenpaare einlagert [Lang, 1975] und dadurch die Reparatur von Thymidindimeren (excision repair) nach UV-Bestrahlung erheblich beeinträchtigt [Lang, 1971, 1975]. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß bei Koffeinkonzentrationen, höher als 3×10^{-5} M, eine zunehmende Destabilisierung der sekundären DNS-Struktur einsetzt [Lang 1974, 1975], wodurch die Entstehung chromosomaler Aberrationen begünstigt sein könnte.

Aus den biochemischen Untersuchungen von Braun und Grossman [1974] und Braun et al. [1975] geht hervor, daß Koffein auf die Aktivität von Reparaturenzymen einen hemmenden Einfluß besitzt. Sie konnten eine kompetitive Reaktion von Endonuklease mit der DNS und mit Koffein nachweisen, was sie auf die molekulare Struktur des Koffeins als methyliertes Oxypurin zurückführen. In Bezug auf andere, am Reparaturprozess beteiligte Enzyme bestehen aufgrund einiger Untersuchungen zwar Hinweise auf eine Koffein-Enzym-Wechselwirkung, jedoch konnten deren Ergebnisse bis jetzt nicht in Übereinstimmung gebracht werden.

Die Untersuchung der Koffeinwirkung in kultivierten Zellen nach Bestrahlung erbrachte ähnlich gegensätzliche Resultate, wie die genetischen Tests.

In Drosophilazellen [Trosko und Wilder, 1973] und in Fibroblasten von Maus und Mensch [Regan et al., 1968; Trosko und Chu, 1973] war keine Beeinflussung der Reparatur festzustellen, wohingegen die Reparatur strahleninduzierter Brüche in menschlichen Lymphozyten stark beeinträchtigt war [Haikazyian et al., 1973;], was zu erhöhten Raten chromosomaler Aberrationen führte [Natarajan et al., 1980].

Natarajan et al., [1980] untersuchten den Einfluß von Koffein auf die Raten strahleninduzierter Aberrationen in verschiedenen Zellzyklusstadien und an den Lymphozyten von Probanden mit Reparaturdefekten (Down Syndrom, Ataxia telangiectasia). Die Ergebnisse zeigen, daß Koffein sowohl einen quantitativen als auch einen qualitativen Einfluß auf die Aberrationen hat, und daß dieser Einfluß zum einen vom Zeitpunkt der Bestrahlung und zum anderen davon abhängig ist, wann und für wie lange die Koffeinbehandlung erfolgt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Koffein sich als ein, die Reparatur beeinflussendes Agens erwiesen hat, welches einerseits direkt, durch seine Interaktion mit der DNS und andererseits indirekt, durch die Hemmung der Aktivität der Reparaturenzyme wirkt.

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluß des Koffeins auf die Aberrationsraten in den Lymphozyten verschiedener Säugetierarten und des Menschen in der G₂-Phase untersucht werden. Als Voraussetzungen für diese Untersuchung ist es zunächst erfor-

derlich, die Kultivierungseigenschaften der verschiedenen Blute unter gleichen Bedingungen zu untersuchen. Ferner ist es notwendig eine Bestimmung der Zellkinetik vorzunehmen, um die Röntgenbestrahlung der Zellen zu vergleichbaren Zeiten vornehmen zu können. Eine Analyse der Strahlenempfindlichkeit der Zellen im G0-Stadium ist den eigentlichen Experimenten vorangestellt, um die aus der Literatur bekannten Ergebnisse zu überprüfen und einen Vergleich mit den G2-Experimenten zu ermöglichen.

Unter der Voraussetzung, daß die Rate strahleninduzierter Aberrationen von der Kapazität der Reparatursysteme abhängig ist, müßte sich der Einfluß des Koffeins in einer erhöhten Rate offener Brüche, sowie aufgrund einer verzögerten Reparatur durch das vermehrte Auftreten von Translokationen zeigen.

Die Koffeineffekt soll anhand der zwischen behandelten und unbehandelten Zellen nach Bestrahlung von G2-Phase-Zellen auftretenden Unterschiede in den Raten chromatidaler Aberrationen bestimmt werden. Sich daraus ergebende Koffeinfaktoren für die relative Reparatur, als dem Verhältnis der an Translokationen beteiligten und den offenen Chromatidbrüchen, sollen Hinweise für die Vergleichbarkeit der speziesspezifischen Reparaturkapazitäten liefern.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1 Das Blut

Die Experimente zu vorliegender Arbeit sind mit dem Blut vier verschiedener Säugerspezies durchgeführt worden. Es handelt sich dabei um: a) Mensch (*Homo sapiens*),

b) Schimpanse (*Pan troglodytes*),

c) Schwein (*Sus scrofa*) und

d) Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*).

Menschliches Blut wurde mit einer sterilen Einweg-Spritze aus der Armvene eines gesunden Spenders entnommen und in Lithium-heparinisierte Probenröhrchen (Stayne, Belgien) gefüllt.

Schimpansenblut wurde auf die gleiche Weise gewonnen. Vor der Blutentnahme, die an einer Oberschenkelvene vorgenommen wurde, mußten die Tiere jedoch betäubt werden. Während des Transports vom Zoologischen Garten in Antwerpen zum Labor in Geel, wurden die Blutproben in einem Kühlbehälter aufbewahrt.

Das Blut von Schweinen stammte vom örtlichen Schlachthof. Die Tiere wurden durch Punktion des Herzens (Abstechen) getötet. Ein Teil des aus dem geöffneten Brustraum strömenden Blutes wurde in Probenröhrchen aufgefangen. Im Labor wurde das Blut dann in neue, heparinisierte Röhrchen umgefüllt, um die ansonsten eintretende Koagulation der Blutzellen zu verhindern.

Beim Kaninchen erfolgte die Blutentnahme aus einer marginalen Ohrvene. Das Tier wurde hierzu in einer speziellen Vorrichtung arretiert und die betreffende Stelle eines Ohres enthaart, die freiliegende Vene durch einen Schnitt mit einer Rasierklinge geöffnet und das herauslaufende Blut in einem Probenröhrchen gesammelt.

Bis zum Ansatz der Kulturen wurden die Blute im Kühlschrank bei 4 Grad C aufbewahrt.

2.2 Die Blutkultur, modifiziert nach Arakaki und Sparkes [1963] und die Präparation der Chromosomen

Unter aseptischen Bedingungen wurde hierfür eine Probe möglichst frischen Blutes (0,1 ml Blut pro ml Kulturvolumen) in einem mit entsprechender Menge Kulturflüssigkeit gefüllten und gut zu verschließenden Gefäß bei 37 Grad C inkubiert.

Die Kulturflüssigkeit bestand aus Nährmedium und Serum. Damit die Lymphozyten aus der mitotischen Ruhe des G₀-Stadiums in die G₁-Phase des Zellzyklus transformieren und mitotisch aktiv werden, wurde Phytohämagglutinin als Mitogen hinzugefügt. Um eine Kontamination der Kulturen mit Bakterien zu verhindern, waren in der Kulturflüssigkeit noch Antibiotika enthalten.

Die Kulturflüssigkeit war in ihrer Zusammensetzung bei allen Experimenten gleich. Sie wurde jeweils kurz vor Versuchsbeginn wie folgt angesetzt:

- 240 ml HAM's F-10 Medium [HAM, 1963],
(Flow Laboratories, UK) und
1,2 ml L-Glutamin (2 mM, Gibco) wurden mit 10 N NaOH
auf einen pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 gebracht.
Danach wurde der pH-Wert mit
300 mg NaHCO_3 auf 7,6 eingestellt.
Dem Medium wurden dann nacheinander
30 ml Kälberserum (TC Bovine Serum (Calf),
Desiccated, Difco + tridestilliertes Wasser),
3,75 ml Phytohämagglutinin (30 mg PHA, Wellcome
Reagents Ltd., UK) und
1,8 ml Penicillin | Streptomycin
(10.000 I.E./ml, Gibco) zugegeben.

Die fertige Kulturflüssigkeit wurde durch Mikrofiltration mit einem $0,22 \mu\text{m}$ Filter (Millipore Corporation, USA) sterilisiert und in sterile Kulturasflaschen gefüllt.

Je nach Art der Versuche, wurden die Kulturen entweder in 150 oder 25 ml Glasflaschen mit Schraubverschluß angesetzt. Für die beiden Flaschengrößen waren die Proportionen von innerem Querschnitt und Volumen gleich; außerdem wurden die Kulturflaschen so beschickt, daß das Verhältnis zwischen Volumen und Füllmenge (Kultur) etwa 5:1 betrug (150 ml Flasche: 30 ml Kultur; 25 ml Flasche: 5 ml Kultur). Auf diese Weise waren in allen Kulturen stets vergleichbare Bedingungen gewährleistet. Nach einer entsprechenden Kulturdauer erhielten alle Kulturen pro ml, 0,2 ml einer 10^{-5} M Colchicin-Lösung (Merck).

Durch dieses Spindelgift werden die Chromosomen der teilungsaktiven Zellen an ihrer Segregation (Anaphase) gehindert, was nach einiger Zeit zu einer Ansammlung von Metaphasen in der Kultur führt. Dieser Behandlung folgte die Präparation der Lymphozyten auf Objektträger (Aufarbeitung).

Die Kulturen (5 ml) wurden hierfür in konische, 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt, die Zellen dann bei 2500 U/min in 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Daran anschließend wurden die Zellen vorsichtig in etwa 10 ml einer 0,075 M, hypotonen KCl-Lösung resuspendiert und darin für 10 Minuten bei Zimmertemperatur belassen.

Mit dieser Behandlung wird eine Wasseraufnahme bewirkt, die zu einer Volumenvergrößerung der Zellen führt, womit eine gute Ausbreitung der Chromosomen in den Zellen erreicht wird.

Nachdem erneut 5 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt worden war, wurden die Zellen mit einem Gemisch aus Methanol und Essigsäure (3 + 1) fixiert. Hiernach wurde wiederum abzentrifugiert, und der Überstand entfernt. Dieser Vorgang (Waschen) wurde sooft wiederholt, bis sich ein völlig klarer Überstand zeigte, der bis auf einen Rest von etwa 1 ml entfernt wurde. In dieser Menge Fixativ wurden die als farblos-er Niederschlag erscheinenden Zellen resuspendiert und mit einer Pipette auf trockene und fettfreie Objektträger aufgetropft. Entsprechend gekennzeichnet (Datum etc.), konnten die Präparate dann weiter behandelt werden.

2.3 Die Markierung der DNS mit BrdU und die differentielle Färbung der Metaphasechromosomen

Die Analyse der Zellkinetik (A) und die Untersuchungen der Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten während der G₀-Phase (B) machten es erforderlich, aufeinander folgende Mitosen an ihren Metaphasechromosomen unterscheiden zu können. Deshalb wurde die DNS der Chromosomen mit 5-Brom-desoxy-Uridin (BrdU), einem Basenanalogue des Thymidins, markiert. Sofort nach Ansatz erhielten die Kulturen 10 µg/ml BrdU (Sigma Chemicals Company, USA). Um den Zerfall dieser lichtempfindlichen Substanz durch Photolyse zu vermeiden [Ikushima und Wolff, 1974], wurde jede Kultur in Aluminiumfolie verpackt.

Bei der DNS-Replikation während der S-Phase des Zellzyklus wird in die jeweils neu synthetisierten DNS-Stränge BrdU an Stelle von Thymidin eingebaut. In Metaphasen der ersten Mitose nach BrdU-Inkorporation treten demnach Chromosomen auf, deren Chromatiden in jeweils einem DNS-Einzelstrang mit BrdU substituiert sind (T=B). Nach einer weiteren Replikationsrunde in Gegenwart von BrdU sind aus den einfach substituierten DNS-Molekülen Chromosomen entstanden, die in ihrer einen Chromatide einfach substituiert bleiben, während ihre andere Chromatide in beiden Einzelsträngen BrdU aufweist (B=B). In der hierauf folgenden Anaphase werden einfach (T=B) und doppelt (B=B) substituierte Chromatiden (DNS) voneinander getrennt, sodaß die Metaphasen einer dritten Mitose nach erneutem BrdU-Einbau zur

Die Inkorporation von BrdU in die DNS

Zellzyklusstadium	Markierungsmuster
	T=T
G0-Phase und Transformation	T=T
	T=T
	T T
erste S-Phase	T B T
	T B B T
	T=B B=T
Metaphase der ersten Mitose	T=B-O-B=T
	T=B B=T
	T B
zweite S-Phase	T B B
	T B B B
	T=B B=B
Metaphase der zweiten Mitose	T=B-O-B=B
	T=B B=B
	T B B B B
dritte Phase	T B B B B B B
	T B B B B B B
	T=B B=B B=B B=B
Metaphase der dritten Mitose	T=B-O-B=B B=B-O-B=B
	T=B B=B B=B B=B

Symbole: "T" Thymidin, "B" BrdU, "-O-" Kinetochor

Hälfte Chromosomen zeigen, die in beiden Chromatiden doppelt mit BrdU substituiert sind (B=B, B=B). Die andere Hälfte der Metaphase gleicht im Markierungsmuster den Chromosomen einer zweiten Mitose (T=B, B=B). Die Markierungsunterschiede wurden durch die differentielle Anfärbung der Metaphasechromosomen sichtbar gemacht.

a) Die differentielle Färbung nach Korenberg und Freedlender
[1974]

Diese Methode beruht auf dem Prozess der Denaturierung der DNS und ihrer anschließenden, entsprechend der BrdU-Inkorporation veränderten Renaturierung.

Die trockenen Objektträger wurden für 8 Minuten in eine auf 88 Grad C erwärmte 1 M NaH_2PO_4 -Lösung gestellt, die zuvor mit festem NaOH auf pH 8,0 gebracht worden war. Die Präparate wurden hiernach ausgiebig in destilliertem Wasser gespült und 10 Minuten in einer bei pH 7 gepufferten GIEMSA-Lösung (5 % Azur-Eosin-Methylenblau-Stammlösung, Merck) gefärbt, dann erneut, kurz in Wasser gespült und an der Luft getrocknet.

Um eine bei dieser Färbung auftretende und beim Auswerten hinderliche Bandenmusterung der Chromosomen zu vermeiden, war es empfehlenswert, Präparate zu verwenden, die wenigstens eine Woche alt waren.

b) Die differentielle Färbung nach Perry und Wolff [1974]
(FPG-Methode)

Die FPG-Methode (fluorochrome-plus-GIEMSA method) erfordert die Behandlung der präparierten Metaphasechromosomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff HOECHST 33258 (Hoechst). Hierfür wurden die Präparate für 10 Minuten in eine 2 %-ige Lösung dieser Substanz (Stammlösung: 250 $\mu\text{g/ml}$) eingestellt, anschließend gespült und danach für 24 Stunden der intensiven Beleuchtung mit einer 40 W

Leuchtstofflampe ausgesetzt. Um ein Austrocknen während dieser Zeit zu verhindern, wurden die Präparate mit einigen Tropfen PBS (siehe nachstenden Übersicht) und mit einem Deckgläschen versehen, in einer "feuchten Kammer" belichtet.

Nach dieser Zeit wurden die Präparate den Bestrahlungsbehältern entnommen, der Deckgläschen entledigt und gespült, für 2 Stunden bei 67 Grad C mit 1 x SSC (siehe nachstende Übersicht) behandelt, danach reichlich in Wasser gespült und zuletzt mit GIEMSA gefärbt.

PBS (phosphate buffered saline):

Lösung 1:

8,0 g NaCl

0,2 g KCl

1,15 g Na_2HPO_4

0,2 g KH_2PO_4

in 800 ml dest. Wasser

Lösung 2:

0,1 g CaCl_2

in 100 ml dest. Wasser

Lösung 3:

0,1 g $\text{MgCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$

in 100 ml dest. Wasser

die Lösungen 1, 2 und 3 ergeben insgesamt 1000 ml PBS.

SSC (saline sodium citrate):

17,35 g NaCl

in 1000 ml dest. Wasser (= 0,3 M)

+ 8,89 g Na-citrat

in 1000 ml dest. Wasser (= 0,03 M)

insgesamt:

2000 ml SSC-Stammlösung (5 x SSC)

2.4 Die Autoradiographie nach radioaktiver Markierung der DNS mit tritiiertem Thymidin

Zur Bestimmung der G₂-Phase (C) und für die Untersuchung des Reparaturgeschehens nach der DNS-Synthese (D) war es notwendig, die DNS der Lymphozyten radioaktiv zu markieren. Aus diesem Grund wurde den Kulturen je ml, 2 μ Ci 6-³H-Thymidin (New England Nuclear Chemicals, USA), mit einer spezifischen Aktivität von 5,4 Ci/mmol zugegeben. Der Einbau dieser Substanz in die DNS der Chromosomen wurde durch die Autoradiographie der aus diesen Kulturen hergestellten Präparate nachgewiesen. Vorher jedoch wurden die Präparate in Orcein-Essigsäure-Milchsäure (OEM) über Nacht gefärbt und danach in 45 %-iger Essigsäure differenziert. Eventuell noch anhaftender Farbstoffüberschuß wurde durch Spülen mit Ethoxyethanol entfernt.

Nach dem Trocknen wurde eine erste Analyse vorgenommen, wobei besonders auf die Verteilung der Zellen auf dem Objektträger, die Ausbreitung der Chromosomen in den Zellen und den Grad der Verunreinigung geachtet wurde. Die qualitativ besten Präparate wurden für die Autoradiographie verwendet.

In einem vollständig abgedunkelten Fotolabor wurde ein Teil einer Filmemulsion (L4 Nuclear Research Emulsion, Ilford Ltd., UK) mit zwei Teilen destilliertem Wasser verdünnt und in einer Küvette im Wasserbad auf 40 Grad C erwärmt. In diese temperierte Filmemulsion wurden die Präparate paarweise, mit ihren zellfreien Flächen aneinanderliegend, für kurze Zeit

eingetaucht (dipping-technique), dann einzeln in Objekthalter gestellt und bei ca. 40 Grad C unter guter Belüftung auf einer Warmhalteplatte getrocknet. Nach ungefähr einer Stunde wurden die Präparate in Färbereinsätze sortiert und in lichtdichte Behälter verpackt. Um die Bildung von Feuchtigkeit zu verhindern, enthielten die Behälter ein Kissen mit etwa 100 g Silikagel als Trockenmittel. Die verpackten und mit Film beschichteten Präparate wurden dann eine Woche im Kühlschrank bei etwa 4 Grad C aufbewahrt. Während dieser Zeit erfolgte die Autoradiographie. Die weiche Beta-Strahlung (Elektronen), die von der radioaktiv markierten DNS ausgeht, bewirkt in der Filmschicht den Zerfall des sehr fein verteilten Silberbromids (AgBr). Wird der Film nun entwickelt und fixiert, dann wird das dissoziierte Silber (Ag^+) zu elementarem, metallischem Silber reduziert, woraufhin alle Zellen, die tritiiertes Thymidin inkorporiert haben, von mikroskopisch kleinen Silberkörnchen überlagert sind.

Nach beendeter Autoradiographie wurden die Präparate mit den Färbereinsätzen für circa 4,5 Minuten in mit Entwickler (D-19b, Eastman Kodak Company, USA) gefüllte Küvetten gestellt und danach 30 Sekunden in Leitungswasser gespült. Der Film wurde dann fixiert (10 min, Kodak Acid Fixer) und anschließend eine halbe Stunde gewässert. Das Entwickeln, Spülen und Fixieren erfolgten bei einer Temperatur der Lösungen von 18 Grad C. Die Arbeiten wurden bei schwachem Rotlicht durchgeführt. Nach dem Wässern wurden die Präparate 5 Minuten mit GIEMSA nachgefärbt und zuletzt an der Luft getrocknet.

2.5 Die Röntgen-Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen wurde mit einer PHILIPPS RT 250 Röntgenanlage bei 250 kv und 15 mA und unter Verwendung eines 0,5 mm Cu-Filters durchgeführt. Die Dosimetrie erfolgte durch das Einsetzen einer PHILIPPS Ionisationskammer (Typ 47/489/10) in ein leeres Bestrahlungsgefäß (Kulturflasche). Der Abstand zur Röntgenröhre wurde stets so groß gewählt, daß eine Dosisrate von 100 rad/min erreicht wurde.

Zum Betrachten der Lymphozyten im G0-Stadium wurde 1 ml frisches Vollblut je Dosis in 25 ml Kulturflaschen gefüllt und in 42 cm Abstand von der Strahlenquelle placiert.

Für die Bestrahlung der kultivierten Lymphozyten während der G2-Phase, wurden die 150 ml Kulturflaschen stehend, in einer Entfernung von 44,5 cm über der Strahlenaustrittsöffnung mit einer Stativklemme befestigt. Auf diese Weise wurde das Zellsediment von unten, durch den Flaschenboden bestrahlt.

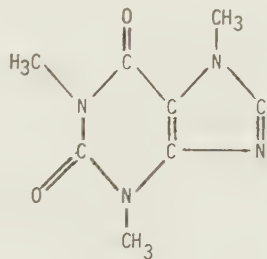
Für den Transport der Kulturen vom Labor zur Bestrahlungseinrichtung und zurück wurde ein isolierter Behälter verwendet, der mit 37 Grad C warmem Wasser gefüllt war. Die Kulturen wurden nur für die Dauer der Bestahlung daraus entnommen.

2.6 Die Koffeinbehandlung

Unmittelbar nach der Bestrahlung in der G2-Phase, erhielt die Hälfte aller Kulturen, einschließlich der unbestrahlten Kontrollen, 50 μ l einer Koffein-Lösung mit einer Konzentration von 20 mg/ml (= 1 mg pro 5 ml Kultur).

Koffein:

1,3,7-Trimethylxanthin (Merck)
MG = 194,19



2.7 Die Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte mit einem ZEISS Photomikroskop, bei 1000-facher Vergrößerung (Objektiv: ZEISS Neofluar 100/Oel). Gegenstand der Auswertung waren die Metaphasen der kultivierten Lymphozyten. Sie wurden hinsichtlich der im Kapitel QUALITATIVE VERSUCHSERGEBNISSE (4.) erläuterten Parameter untersucht.

Der Auswertungsmodus wird jeweils zu Beginn der Darstellung der QUANTITATIVEN VERSUCHSERGEBNISSE (5.) angegeben.

3. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

3.1 Die Voruntersuchung

Vor Beginn der eigentlichen Experimente wurde die Verwendbarkeit des vorstehend beschriebenen Kultursystems für die Blute der vier Spezies überprüft. Von jedem Blut wurden einzelne Kulturen angelegt (2.2) und nach 48 Stunden, einschließlich einer Colchicinbehandlung von 2,5 Stunden fixiert. An gut ausgebreiteten Metaphasen wurden die verschiedenen Karyotypen hinsichtlich Zahl und Größe ihrer Chromosomen, der Lage der Zentromere und anderer, struktureller Besonderheiten analysiert. Parallel dazu wurden Kulturen mit BrdU behandelt und die davon hergestellten Präparate differentiell gefärbt (2.3). Die jeweilige Verteilung der aufeinanderfolgenden Metaphasen nach 48 Stunden Kulturdauer sollte Anhaltspunkte für einen sinnvollen zeitlichen Umfang der Zellkinetikanalysen liefern.

3.2 Die Analyse der Zellkinetik (A)

In dieser Untersuchung sollten der Zeitraum für die G0-G1-Transformation der Lymphozyten und die Dauer ihres Zellzyklus

ermittelt werden und damit die Wahl geeigneter Kultivierungs- und Behandlungszeiten in den noch folgenden Untersuchungen ermöglicht werden. In Lymphozytenkulturen wurde das Auftreten erster, zweiter und weiterer Mitosen (M1, M2 und M3) zu verschiedenen Fixierungszeiten bestimmt.

Die Untersuchung wurde mit dem Blut mehrerer Spender einer Art durchgeführt.

Übersicht

Spezies	Spender*	
Mensch	Ma, Mb, Mc, Md, Me	(M = MAN)
Schimpanse	Ca, Cb	(C = CHIMPANZEE)
Schwein	Pa, Pb, Pc	(P = PIG)
Kaninchen	Ra, Rc, Rd	(R = RABBIT)

* a, b, c, d, und e sind verschiedene Individuen einer Art

Während der gesamten Kulturdauer wurden die Zellen mit BrdU behandelt und nach der Präparation auf Objektträger einer differentiellen Färbung unterzogen. Vor dem Aufarbeiten waren die Kulturen für 2,5 Stunden mit Colchicin behandelt worden. Je Spender und Fixation wurden jeweils zwei Kulturen mit einem Volumen von 5 ml, in 25 ml Kulturflaschen angesetzt.

Die Ergebnisse der Vorversuche lieferten die Hinweise für den Umfang der jeweiligen Untersuchungszeiträume, die im Versuchsplan A angegeben sind.

Versuchsplan A:

Spezies	Fixierungen (+)													
Mensch	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Schimpanse	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Schwein	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kaninchen	+					+				+				
Kultur- :	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72		
dauer (h):	26	30	34	38	42	46	50	54	58	62	66	70		

Beim Menschen erstreckt sich der Untersuchungszeitraum von der 34. bis zur 72. Stunde, und beim Schimpansen liegt er zwischen 32 und 70 Stunden. Schweinelymphozyten wurden zwischen der 26. und 48. Stunde, mit zweistündigen Intervallen aufgearbeitet. Beim Kaninchen blieb die Untersuchung auf die Kontrollen der Bestrahlungsexperimente (B) nach 32, 42 und 48 Stunden Kulturdauer beschränkt, da bereits eine umfangreiche Analyse im selben Labor angefertigt worden war [Fabry und Léonard, 1980].

3.3 Die Bestrahlung der Lymphozyten in der G₀-Phase (B)

Die Experimente dieser Untersuchung wurden mit den selben Kultur- und Färbemethoden durchgeführt wie die Analysen der Zellkinetik (A). Allerdings war das hierfür eingesetzte Blut vor der Kultivierung mit Röntgenstrahlen bestrahlt worden.

Es wurden Dosen von 25, 50, 100, 200, 300 und 400 rad appliziert (2.5). Zur Überprüfung der Zellkinetik und zum Vergleich mit bestrahlten Lymphozyten, wurde in jedem Experiment und von jedem Spender als Kontrolle unbestrahltes Blut kultiviert.

Um die Strahlenempfindlichkeit von Lymphozyten zu untersuchen, die zu unterschiedlichen Zeiten in die erste Mitose eintreten, wurden Kulturen nach verschiedener Kulturdauer aufgearbeitet. Die Fixierungszeiten wurden so gewählt, daß nach kürzester Kultivierung schon zweite (M2) Metaphasen auftraten und nach längster Kultivierung noch erste (M1) Metaphasen anzutreffen waren (vergl. Ergebnisse A). Vom Blut jedes Spenders wurden, je Dosis und Fixierung, zwei 5 ml Parallelkulturen angelegt.

Versuchsplan B:

Spezies	Mensch		Schimpanse			Schwein			Kaninchen		
Spender	Ma	Ma	Cc	Ca	Cb	Pd	Pe	Pg	Ra	Rc	Rd
				Cb	Cb		Pf	Ph	Rb	Rc	Rd
Kultur- dauer (h):	48	72	40	48	60	30	36	44	42	48	
Dosis (rad)											
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25		+		+				+	+	+	+
50	+	+		+	+		+	+	+	+	+
100	+	+		+	+		+	+	+	+	+
200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
300		+		+				+	+	+	+
400		+		+			+	+	+	+	+

3.4 Die Bestrahlung der Lymphozyten während der G₂-Phase und die Koffeinbehandlung (C)

Die Experimente waren so angelegt, daß die Reparatur von strahleninduzierten DNS-Brüchen während der gesamten Dauer der G₂-Phase untersucht werden konnte. Aus Gründen der besseren Dosimetrie und um eventuelle, von Kultur zu Kultur auftretende Unterschiede in einzelnen Parametern, wie zum Beispiel im pH-Wert und in der Zahl der Zellen zu vermeiden, wurden die für verschiedene Fixierungen vorgesehenen Kulturen zusammengefaßt. Mit dem Blut jedes Spenders wurden für jede Strahlendosis und für die Kontrolle (0 rad), jeweils 32 ml Kulturen in 150 ml Glasflasche angesetzt (2.2). Die Bestrahlung der Kulturen mit 50, 100 und 200 rad erfolgte entsprechend der, in 2.5 definierten Bedingungen und wurde zu jeweils der Zeit durchgeführt, da in den Lymphozytenkulturen der vier untersuchten Spezies ungefähr die gleiche Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen angenommen werden konnte (vergl. Ergebnisse A).

Versuchsplan C:

Spezies	Spender	Bestrahlung	Fixierungen			
			I	II	III	IV
Mensch	Ma	60	62	64	66	68
Schimpanse	Cb	60	61	62	64	66
Schwein	Pi	41	41,5	42	43	45
Kaninchen	Rc	41	42	43	44	46

Stunden nach Kulturansatz

Unmittelbar nach Bestrahlung erfolgte die Markierung der DNS mit tritiiertem Thymidin (2.4). Dadurch sollte ermöglicht werden, all jene Zellen gesondert betrachten zu können, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase ihres Zellzyklus befunden haben. Die 32 ml Kulturen wurden gleichmäßig auf je acht sterile, 15 ml Polyethylen-Teströhrchen verteilt (4 ml/Teströhrchen), die mit 8,0 ml Colchicininlösung gefüllt und auf 37 Grad C erwärmt waren. Außerdem enthielt jedes der Teströhrchen 50 ul einer $6\text{-}^3\text{H}$ -Thymidin-Lösung (0,2 mCi/ml). Für jede Fixierung waren zwei dieser Teilkulturen vorgesehen. Jeweils eine der Kulturen wurde, um das Reparaturgeschehen in den bestrahlten Zellen zu beeinflussen, mit 0,2 mg/ml Koffein behandelt (2.6). Bis zum Aufarbeiten wurde die Kultivierung der Lymphozyten in verschlossenen Teströhrchen bei 37 Grad C fortgesetzt.

Versuchsplan C':

Spezies						Fixierung				
Mensch			I		II		III			IV
Schimpanse		I	II		III		IV			
Schwein	I	II	III		IV					
Kaninchen		I	II	III			IV			IV
Kultur-	: 0	1	2	3	4	5	6	7	8	
dauer nach Bestrahlung, der Zugabe von Thymidin und Koffein										

Die Fixierung I, II, III und IV, sind jeweils innerhalb der doppelten Dauer der G2-Phase durchgeführt worden. Die Dauer der G2-Phase wurde relativ zur geschätzten Zellzyklusdauer festge-

legt, wobei von dem, für die menschlichen Lymphozyten bekannten Zeitraum der G2-Phase von etwa 4-5 Stunden ausgegangen wurde.

Das Aufarbeiten der Kulturen wurde, unter besonderer Beachtung der für den Umgang mit radioaktiven Substanzen geltenden Bestimmungen durchgeführt.

4. QUALITATIVE VERSUCHSERGEBNISSE

4.1 Die Kultivierung und Präparation

a) Menschliches Blut ließ sich problemlos kultivieren und ergab Präparate mit einer ausreichenden Zahl gut ausgebreiteter und auswertbarer Metaphasen;

b) Mit Schimpansenblut wurden, bei ebenso problemloser Kultivierung, gleich gute Präparationsergebnisse erzielt.

c) Die Art der Blutgewinnung (2.1) brachte es möglicherweise mit sich, daß Schweineblut bereits in den Probenröhrchen gerann, wenn nicht besondere Gegenmaßnahmen getroffen wurden.

In jedem Fall jedoch war nach wenigen Stunden der Kultivierung ein Verklumpen der Blutzellen zu beobachten, das sich zumeist erst beim Aufarbeiten der Kulturen durch ein kräftiges Aufschütteln des Zellverbands beseitigen ließ. Bei einer irreversiblen Verklumpung war eine Präparation der Zellen in der Regel erfolglos, was dazu führte, daß einige der Experimente mehrmals wiederholt werden mußten, da sie nicht, oder nur zu einem Teil auswertbar waren. Selbst der Zusatz von Heparin zu den Kulturen konnte eine Agglutination der Zellen nicht immer vermeiden. Versuche mit dem Blut aus einer peripheren Ohrvene eines leben-

den Tieres erbrachten keine veränderten Resultate, obwohl in den Probenröhrchen, sogar nach einigen Tagen der Aufbewahrung, keine Koagulation der Blutzellen eintrat.

d) Die Präparate von Kaninchenblutkulturen waren durch eine, in der Regel sehr geringe Mitoserate gekennzeichnet. Hinsichtlich der Ausbreitung der Chromosomen entsprachen die Präparate jedoch den gestellten Anforderungen.

4.2 Die verschiedenen Karyotypen

Beim Auswerten der Präparate aus den Vorversuchen wurden die Karyotypen der vier Spezies anhand vollständiger und gut ausgebreiteter Metaphasen charakterisiert:

a) Der Mensch gehört zur Ordnung der Primaten und besitzt in den somatischen Zellen 46 Chromosomen. Bei 34 der 44 Autosomen befindet sich das Zentromer in der Mitte (metazentrisch), oder es ist aus der Mitte verschoben (submetazentrisch), zwischen zwei Chromosomenarmen angeordnet. Die übrigen zehn Autosomen werden aufgrund der Lage ihres Zentromers (acrozentrisch) aus nur einem Chromosomenarm gebildet, dem auf der anderen Seite des Zentromers, nach einer sekundären Einschnürung ein kleiner Satellit gegenüberliegt. Die das Geschlecht bestimmenden Gonosomen werden durch ein mittelgroßes submetazentrisches X- und

durch ein kleines, keinen Satelliten tragendes, acrozentrisches Y-Chromosom repräsentiert. Der männliche Karyotyp zählt 81 Chromosomenarme.

b) Ebenfalls zu den Primaten gehört der Schimpanse, dessen diploider Chromosomensatz aus 34 meta- oder submetazentrischen und zwölf acrozentrischen Autosomen, sowie aus zwei Gonosomen besteht. Wie beim Menschen, tragen zehn der acrozentrischen Autosomen Satelliten. Als Gonosomen treten ein satellitenloses acrozentrisches Y- und ein submetazentrisches X-Chromosom auf. Der Karyotyp des männlichen Schimpansen zeigt, bei insgesamt 48 Chromosomen, 83 Chromosomenarme.

c) Das Schwein, das den Spalthufern (Artiodactyla) zugeordnet wird, besitzt im diploiden Chromosomensatz 36 Autosomen. Davon sind zwölf acrozentrisch und 24 metazentrisch oder submetazentrisch. Bei einem Paar der kleinen metazentrischen Chromosomen sind in jeweils einem Arm und nahe dem Zentromer relativ große, sekundäre Einschnürungen zu erkennen. Mit dem sehr kleinen metazentrischen Y- und dem großen submetazentrischen X-Chromosom befinden sich in den somatischen Zellen des Schweins 38 Chromosomen mit zusammen 64 Chromosomenarmen.

d) Von den 42 Autosomen des Kaninchens, das einer Unterordnung der Nagetiere (Lagomorpha) angehört, sind 34 submetazentrisch oder metazentrisch und acht acrozentrisch. In den Chromosomen sind keine sekundären Einschnürungen zu beobachten. Je nach dem Kondensationsgrad des Chromatins treten bei einigen dieser

Metaphasechromosomen, unterschiedlich lange Zentromerregionen auf. Die beiden Geschlechtschromosomen sind metazentrisch; ein kleines Y und ein mittelgroßes X-Chromosom. Der diploide Satz enthält 44 Chromosomen mit 80 Chromosomenarmen.

Die folgende Übersicht faßt die zahlenmäßig wesentlichen Daten der vier Karyotypen zusammen.

Spezies	Anzahl der Chromosomen	Chromosomenarme	
		männl.	weibl.
Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	46	81	82
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	48	83	84
Schwein (<i>Sus scrofa</i>)	38	64	64
Kaninchen (<i>Oryctolagus caniculus</i>)	44	80	80

4.3 Die differentiell gefärbten Chromosomen

Nach der differentiellen Färbung der Präparate zeigten die Metaphasechromosomen ihrem Markierungsmuster entsprechend (2.3) gefärbte Chromatiden.

In Metaphasen der ersten Mitose nach BrdU-Inkorporation traten ausschließlich Chromosomen mit einheitlich dunkel gefärbten Chromatiden (T=B, B=T) auf (Abb. 4.1).

Nach erneutem Einbau von BrdU waren die DNS-Doppelstränge unterschiedlich markiert (T=B, B=B), was in der zweiten Mitose zu Metaphasechromosomen führte, die in ihrer einen Chromatide (T=B) dunkel und in der anderen (B=B) heller gefärbt waren (Abb. 4.2).

Ein Wechsel zwischen Hell (H) und Dunkel (D) innerhalb einer Chromatide bedeutet einen Austausch von einfach- und doppelt-substituierter DNS und wird als Schwesterchromatidenaustausch (SCE, sister-chromatid exchange) bezeichnet (Abb. 4.2). SCEs stellen eine Rekombination identischer DNS-Moleküle dar.

Außer dieser alternativen Hell/Dunkel-Färbung trat in den Metaphasen dritter Mitosen (Abb. 4.3) noch ein intermediärer Farbton (I) auf (Abb. 4.4). Dieser Effekt war mehr oder weniger ausgeprägt bei allen Spezies zu beobachten und es fiel dabei auf, daß sich in den gepaarten Chromatiden eines Chromosoms stets D und I, sowie I und H, niemals aber D und H gegenüberlagern.

Dieses Phänomen, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht weiter untersucht wurde, könnte durch einen verminderten Einbau von BrdU erklärt werden, wenn davon ausgegangen wird, daß die BrdU-Konzentration während der Kultivierung absinkt. Ein Absinken der BrdU-Konzentration unter das Niveau des Thymidins, durch Zerfall (Photolyse) und Abbau, sowie durch Inkorporation verursacht, könnte zu einem verstärkten Einbau von Thymidin und damit zu intensiverer Anfärbbarkeit solcher Chromatiden führen, deren DNS in beiden Einzelsträngen BrdU-Substitution aufweist. In nachstehender Übersicht soll dieser Sachverhalt verdeutlicht werden.

Die konzentrationsabhängige BrdU-Inkorporation

	1. Mitose				2. Mitose				3. Mitose			
	-----				-----				-----			
1)	0C	W1	1C	W0	0C	W2	2C	W1	0C	W3	3C	W2
	-----				-----				-----			
2)	T=B	B=T			T=B	B=B			T=B	B=B	B=B	B=B
	T=B	B=T			T=T	T=B			T=T	T=T	T=T	T=B
	T=B-0-B=T				T=B-0-B=B				T=B-0-B=B		B=B-0-B=B	
	T=B	B=T			T=B	B=B			T=T	T=B	B=T	T=B
	T=B	B=T			T=T	T=B			T=B	B=T	T=B	B=B
	T=B	B=T			T=B	B=B			T=T	T=B	B=T	T=B
	-----				-----				-----			
3)	1				2/3				1/2			
4)	6:6	6:6			8:4	2:10			9:3	5:7	5:7	3:9
5)	D	D			D	H			D	I	I	H

Die antiparallel orientierten DNS-Einzelstränge "W" und "C" 1) tragen als vor- oder nachgestellte Ziffer die Nummer ihrer in-vitro-Replikation. Die Markierungsmuster der Chromosomen 2) entsprechen einer fiktiven Abnahme der BrdU-Konzentration von der ersten bis zur dritten Replikationsrunde 3). Daraus resultieren die unterschiedlichen Verhältnisse 4) von Thymidin und BrdU (T:B) in dunkel oder hell erscheinenden Chromatiden, was in Metaphasechromosomen der 3. Mitose eine Differenzierung der Farbtintensität in D, I und H ermöglicht 5).

4.4 Die strahleninduzierten Aberrationen

Aufgrund ihrer ionisierenden Wirkung sind Röntgenstrahlen in der Lage, in den Strängen der DNS Brüche zu induzieren. Bei diesen Brüchen handelt es sich zum weitaus größten Teil um Einzelstrangbrüche (single strand breaks). Die überwiegende Mehrzahl aller Brüche wird unmittelbar nach ihrem Eintreten enzymatisch wiederhergestellt (Restitution). Strangbrüche, die sich im DNS-Molekül an gegenüberliegenden Stellen ereignen, werden als Doppelstrangbrüche (double strand breaks) bezeichnet. Unter der Voraussetzung, daß nach der Induktion keine Restitution erfolgt, sondern eine Verlagerung der Bruchenden eintritt, besteht im weiteren Verlauf des Reparaturprozesses die Möglichkeit, daß die benachbarten Bruchenden miteinander verknüpft werden (Reunion). Dieser Vorgang führt in den Chromosomen zu Austauschaberrationen (Translokationen) und muß so erfolgen, daß die Polarität der DNS-Stränge (5'- 3') gewahrt bleibt. Werden die Brüche nach der Induktion weder restituiert noch durch Reunion repariert (misrepair), kann eine Termination der Bruchenden erfolgen, was zum Auftreten offener Brüche in den Metaphasen führt. Abhängig vom Zeitpunkt inner Induktion (Bestrahlung) und der Manifestation während des Zellzyklus, sind verschiedene Aberrationstypen zu beobachten (Abb. 4.1). Es handelt sich dabei um:

1. Chromosomenaberrationen und PCCs
2. Chromatiden- und Subchromatidenaberrationen und
3. achromatische Läsionen.

In einigen Fällen konnten Änderungen des Ploidiegrades (n) in zweiten Mitosen analysiert werden. Wurden in diesen Zellen während der G₀-Phase Aberrationen induziert, so waren diese stets in doppelter Ausfertigung zu beobachten. Neben einigen Endoreduplikationen traten in der Hauptsache Endomitosen als tetraploide ($4n$) Zellen auf. Bei den Endomitosen (Abb. 4.5) hat nach der Kernteilung (Mitose) keine Teilung der Zelle stattgefunden; alle Chromosomen sind einzeln in der Metaphaseebene verteilt. Endoreduplikationen (Abb. 4.6) sind die Folge zweier Replikationsrunden, ohne daß sich dazwischen eine Mitose ereignet hat; identische Chromosomen liegen in den Metaphasen paarweise nebeneinander.

4.4.1 Chromosomenaberrationen und PCCs

Chromosomenaberrationen sind strukturelle Veränderungen innerhalb eines Chromosoms, die sich vor der DNS-Replikation manifestiert haben. Während der Metaphase sind sie in beiden Chromatiden an identischen Stellen zu beobachten.

In den ersten Metaphasen der Zellen, die in der G₀-Phase (B) bestrahlt worden waren, wurden folgende Aberrationsformen ausgewertet: a) dizentrische (oligozentrische) Chromosomen und

b) zentrische und azentrische Ringchromosomen.

Beide Aberrationsformen sind eine Folge von zwei Chromosomenbrüchen, die nach ihrer Reunion zu einer Zentromer-Zentromer-Verbindung führen. Sie werden deshalb als asymmetrische Aberrationen bezeichnet. Symmetrische Aberrationen sind ebenfalls

auf zwei Bruchereignisse zurückführbar und sind mit gleicher Häufigkeit zu erwarten. Weil sie jedoch von nicht-aberranten Chromosomen nur sehr selten eindeutig zu unterscheiden waren, wurden sie bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Ebenfalls unberücksichtigt blieben die offenen Chromosomenbrüche; sie traten nur in sehr geringer Anzahl auf und waren nicht immer sicher zu bestimmen.

a) Dizentrische Chromosomen (Abb. 4.1) stellen Translokationen dar, die durch die Reunion von zwei zentromerhaltigen Chromosomenbruchstücken entstanden sind. Die Reunion der zentromerlosen Bruchstücke führt zu azentrischen Fragmenten, die stets zusammen mit dizentrischen Chromosomen anzutreffen waren.

In einigen Fällen wurden Chromosomen beobachtet, die mehr als zwei Zentromere aufwiesen (oligozentrisch). Ihre Entstehung kann darauf zurückgeführt werden, daß zentromerhaltige Segmente mit zwei freien Bruchenden in eine asymmetrische Chromosomentranslokation einbezogen wurden. Jedem dieser mit zwei weiteren Zentromeren verbundenen Chromosomensegmente läßt sich zusätzlich ein azentrisches Fragment zuordnen.

b) Zentrischen Ringen (Abb. 4.1) können azentrische Fragmente ebenfalls regelmäßig zugeordnet werden. Die Ringbildung erfolgt durch die Reunion der beiden freien Bruchenden zentromerhaltiger Chromosomensegmente. Die azentrischen Fragmente sind die Reunionsprodukte der beiden Bruchstücke, die beiderseits des Zentromers entstanden sind.

Werden innerhalb eines Chromosomensarmes zwei Brüche induziert und verschmelzen beide freien Enden des zentromerlosen Segments miteinander, so entsteht ein azentrischer Ring. Die übrigen beiden Bruchstücke bilden nach ihrer Reunion ein verkürztes Teil-Chromosom, das sich jedoch in den Metaphasen nicht ohne weiteres identifizieren läßt.

Die Ringe und dizentrischen Chromosomen (Abb. 4.2), die in den Metaphasen zweiter Mitosen beobachtet wurden, sind Aberrationen, die nicht als unmittelbare Folge einer Reunion strahlen-induzierter Chromosomenbrüche betrachtet werden können. Ihrer Entstehung liegt entweder eine ungehinderte Verteilung der Austauschaberrationen in der ersten Anaphase mit anschließender, identischer Reduplikation zugrunde, oder sie sind das Reunionsprodukt solcher Chromosomenbrüche, die durch das "Zerreißen" von Anaphasebrücken verursacht wurden.

Azentrische Chromosomenfragmente, die in der Anaphase aufgrund des Fehlens der Spindelfaseransatzstelle (Kinetochor) nicht auf die Tochterkerne verteilt werden, können nach der Zellteilung zur Bildung von Mikrokernen in den Zellen führen. Entstehen während der Interphase (G1-, S- und G2-Phase) Unterschiede in der Entwicklung zwischen Haupt- und Mikrokern, dann kann beim Eintreten des Hauptkerns in die Mitose eine vorzeitige Kondensation des Mikrokernchromatins (PCC = premature chromosome condensation) erfolgen. Der zu dieser Zeit ablaufenden Zellzyklusphase des Mikrokerns entsprechend, sind in Metaphasen der zweiten Mitose G1-, S- und G2-Phase-PCCs zu beobachten.



Abbildung 4.1

Metaphase eines Schimpansenlymphozyten (Spender Cb) in der ersten Mitose (M1), 48 Stunden nach Bestrahlung mit 400 rad in der G₀-Phase:

Es sind ein trizentrisches Chromosom (T), ein dizentrisches Chromosom (D), ein dizentrischer Ring (dR), sowie die entsprechenden Fragmente (f) und zwei azentrische Ringe (r) zu erkennen.

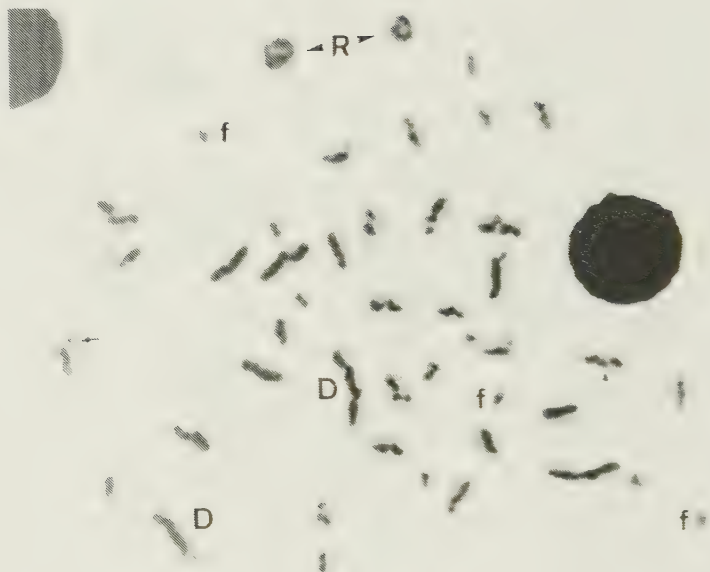


Abbildung 4.2

Kaninchenlymphozyt (Spender Rc) in der Metaphase der zweiten Mitose (M2), 48 Stunden nach Bestrahlung mit 300 rad in der G0-Phase:

Es sind zwei dizentrische Chromosomen (D) und zwei zentrische Ringe (R), sowie 16 SCEs (zwei davon sind durch Pfeile gekennzeichnet) zu erkennen. Außerdem sind drei Fragmente (f) zu erkennen.

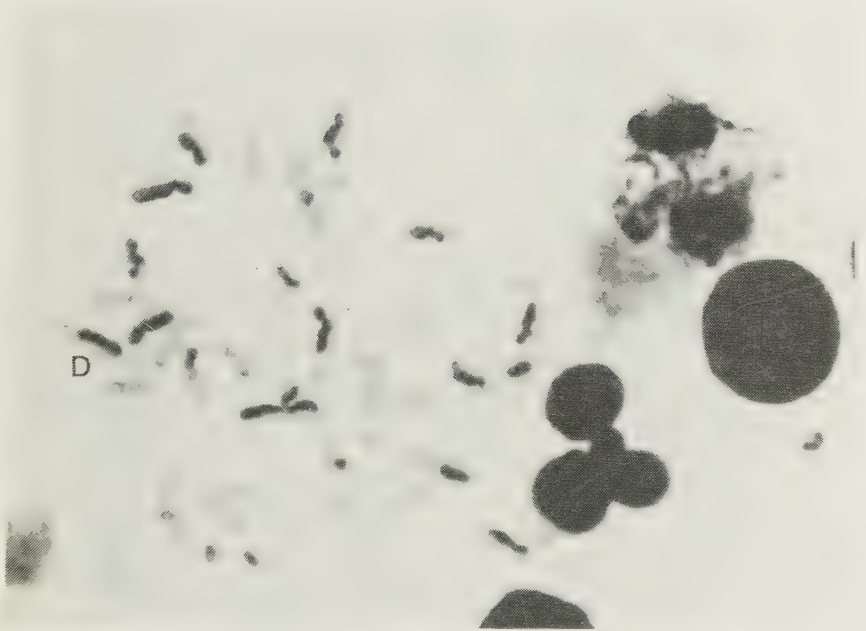


Abbildung 4.3

Metaphase eines Schimpansenlymphozyten (Spender Cb) in der dritten Mitose (M3) 60 Stunden nach Bestrahlung mit 200 rad in der G0-Phase:

Es ist ein dizentrisches Chromosom (D) zu erkennen.



Abbildung 4.4

Metaphase eines menschlichen Lymphozyten (Spender Ma) in der dritten Mitose (M3) 72 Stunden nach Bestrahlung mit 200 rad in der G₀-Phase:

Die Anfärbung der Chromatiden zeigt drei verschiedene Intensitäten: dunkel = D, intermediär = I und hell = H.

Darüberhinaus ist ein S-Phase-PCC (S) zu erkennen.

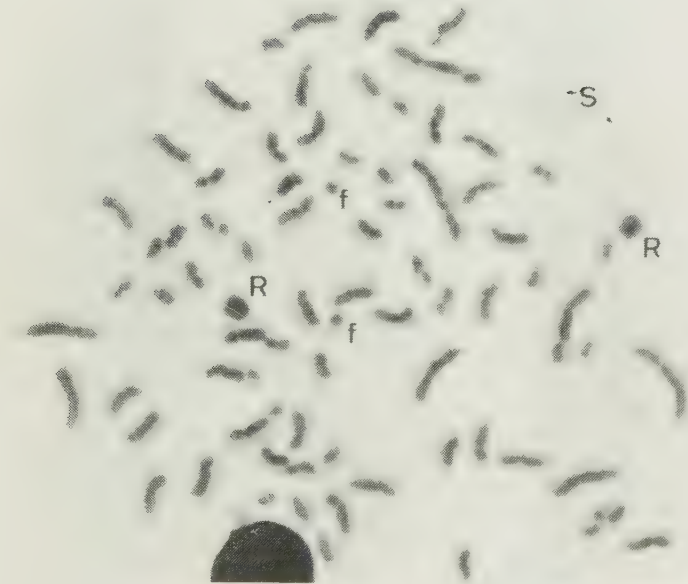


Abbildung 4.5

Tetraploide ($4n$) Metaphase nach der Endomitose eines Schweine-lymphozyten (Spender Pe) 36 Stunden nach Bestrahlung mit 100 rad in der G_0 -Phase:

Es sind zwei zentrische Ringe (R) mit ihren dazugehörigen Fragmenten (f), sowie S-Phase-PCC (S) zu erkennen.

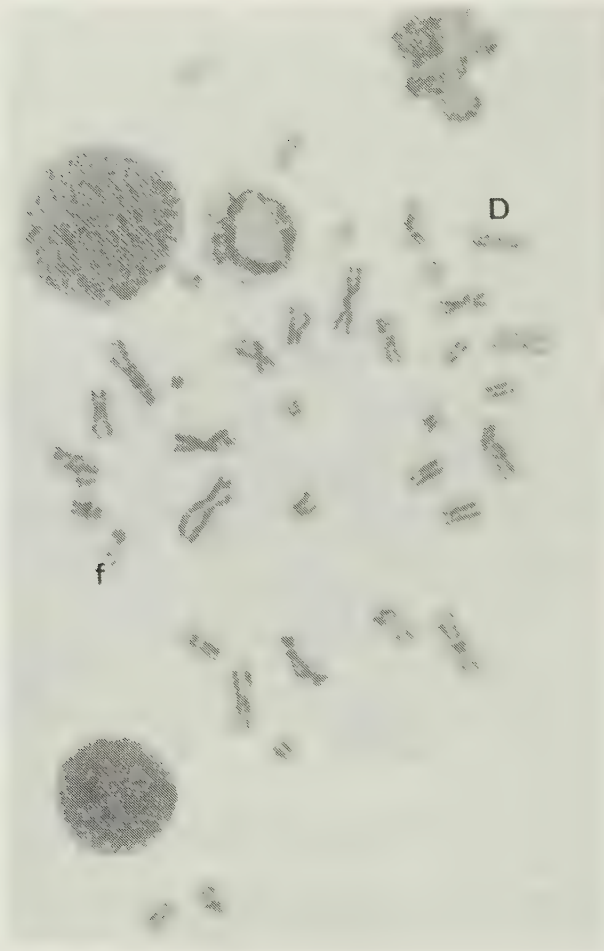


Abbildung 4.6

Tetraploide ($4n$) Metaphase eines menschlichen Lymphozyten (Spender Ma) nach Endoreduplikation, 72 Stunden nach Bestrahlung mit 200 rad in der G₀-Phase:
Es ist ein doppelt repliziertes, dizentrisches Chromosom (D) und das entsprechende Fragment (f) zu erkennen. Die Metaphase ist unvollständig.

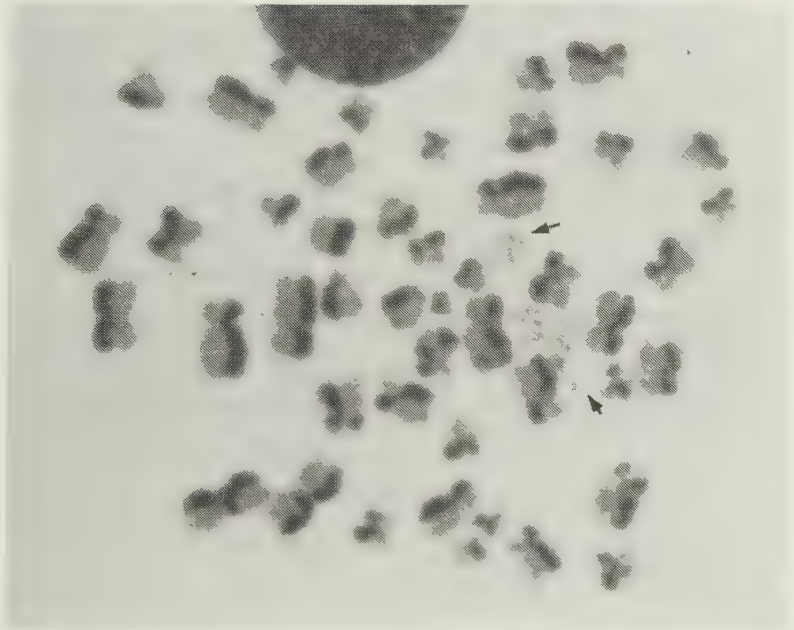


Abbildung 4.7

Metaphase eines menschlichen Lymphozyten (Spender Ma) in der zweiten Mitose (M2) 48 Stunden nach Bestrahlung mit 200 rad in der G0-Phase:
Ein Teil des Chromatins ist als S-G2-PCC (Pfeile) zu erkennen.

Beim G1-PCC treten, ihrem unreplizierten Zustand entsprechend, einsträngige Chromosomen in den Metaphasen auf. Sie sind jedoch auf den Präparaten nicht beobachtet worden.

PCCs der S-Phase lassen in ihrer Struktur keine Kontinuität des Chromatins erkennen und werden daher auch als "Chromosomen-Pulverisation" bezeichnet. Sie waren die am häufigsten zu beobachtende PCC-Form (Abb. 4.5).

G2-Phase-PCC sind in den Metaphasen als doppelsträngige und leiterartig strukturierte Gebilde zu erkennen. Aufgrund der fließenden Übergänge zwischen den verschiedenen Stadien der Interphase gingen auch die, für die PCC-Form charakteristischen Merkmale ineinander über. Es wurden daher relativ oft PCCs des S-G2-Phase-Typs (Abb. 4.7) beobachtet.

4.4.2 Chromatidenaberrationen

Chromatidenaberrationen sind strukturelle Veränderungen innerhalb einzelner Chromatiden. Sie können während der G2-Phase durch Röntgenstrahlen induziert werden. Es wurden ausgewertet:

- a) Chromatid- und Isochromatidbrüche (B' und B'')

- b) Chromatidentranslokationen (RB' und RB'B'') und

- c) Subchromatidentranslokationen (sub-RB')

(RB' = reunited chromatid breaks)

a) Mit B' wurde jede Unterbrechung im Verlauf einer Chromatide bezeichnet, die in ihrer Ausdehnung den Chromatidendurchmesser übertraf oder zu einer Verlagerung des Buchstückes führte,

ohne daß dabei die Paarung identischer Chromatidenabschnitte verloren ging.

Ereignet sich in beiden Chromatiden eines Chromosoms ein Bruch an genau, oder annähernd der gleichen Stelle, dann handelt es sich um einen Isochromatidbruch (B''). In der Regel waren B'' nur als gepaarte Chromatidfragmente zu beobachten und konnten ihrem Ursprungschromosom nicht mehr zugeordnet werden (Abb. 4.9, Abb. 4.10 und Abb. 4.11).

b) RB' sind das Reunionprodukt im Interphasekern benachbarter Chromatidenbrüche. Beim Auswerten der Präparate konnten einige verschiedene Formen dieses Aberrationstyps beobachtet werden. Am häufigsten traten Austauschaberrationen auf, an denen die Chromatiden zweier Chromosomen beteiligt waren ($RB'(2)$). Diese sogenannten "Interchange" waren asymmetrisch oder symmetrisch, je nachdem, ob die Zentromere beider Chromosomen miteinander verbunden waren oder nicht (Abb. 4.8 und Abb. 4.11). Sie sind eine Folge von zwei B' . Jedes, in eine solche Aberration interkalierende Chromosom, war an mindestens zwei Stellen ($2 B'$; B'') gebrochen und führte zu komplexeren Reunionsfiguren.

Als Variante interchromosomaler Austausche traten "Triradiale" ($RB'B''$) auf, die nach Reunion der beiden Bruchenden eines B' mit einem B'' zustandegekommen waren (Abb. 4.8).

Die Reunion von einem B'' oder zwei in einem Chromosom eingetretenen B' führt zu intrachromosomalen Chromatidaustauschen. Danach treten zum Beispiel SU (sisterchromatid union) als "Intrachange" ($RB'(1)$) auf. Diese Aberrationsform war nur in seltenen Fällen zu beobachten (Abb. 4.11).

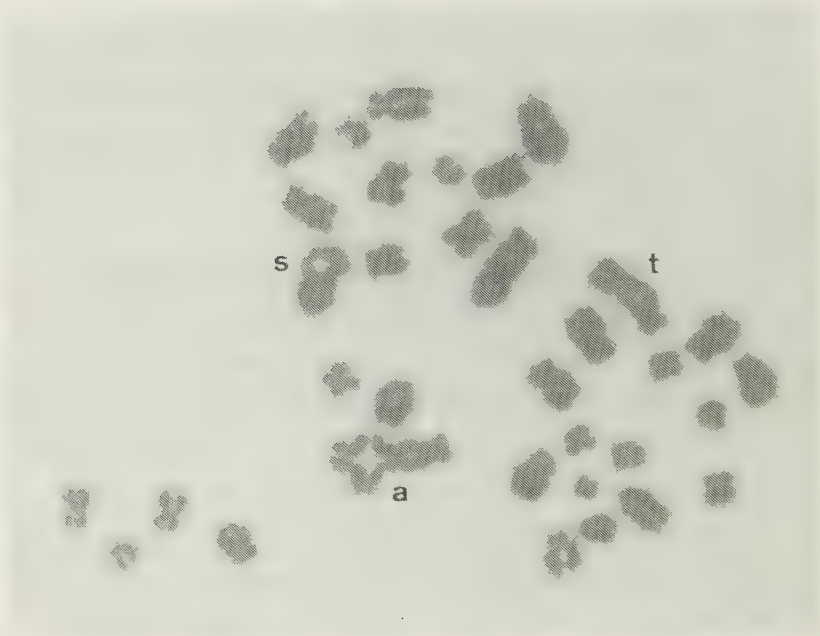


Abbildung 4.8

Metaphase eines Schweinelymphozyten (Spender Pi) zwei Stunden nach Bestrahlung mit 200 rad, Koffeinbehandlung und Autoradiographie:

Es sind ein (s) symmetrisches und ein (a) asymmetrisches "Interchange" aus zwei Chromosomen = $RB'(2)$ und ein (t) "Triradial" = $RB'B$ als Chromatidtranslokationen zu erkennen.

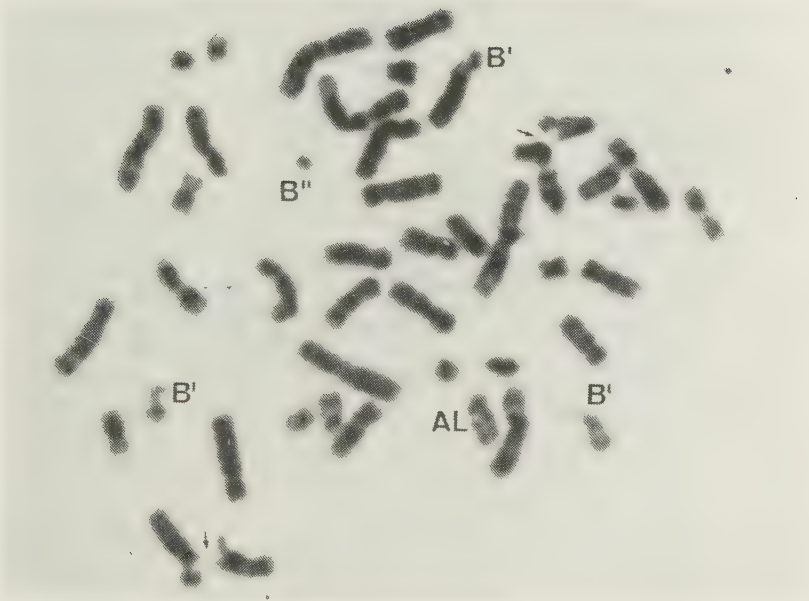


Abbildung 4.9

Metaphase eines menschlichen Lymphozyten (Spender Ma) zwei Stunden nach Bestrahlung mit 100 rad und Autoradiographie: Es sind zwei Subchromatidtranslokationen = sub-RB' (Pfeile), drei Chromatidbrüche (B') und ein Isochromatidbruch (B''), sowie eine achromatische Läsion (AL) zu erkennen.

Abbildung 4.10

Stark geschädigte Metaphase eines Schweinelymphozyten (Spender Pg), 30 Minuten nach Bestrahlung mit 200 rad und Autoradiographie:

Es sind eine Vielzahl an Brüchen und achromatischen Läsionen, sowie einige Translokationsfiguren zu erkennen.

Abbildung 4.11

Metaphase eines Schweinelymphozyten (Spender Pi), vier Stunden nach Bestrahlung mit 200 rad, Koffeinbehandlung und Autoradiographie:

Es sind drei Schwesterchromatidvereinigungen (SU), eine Chromatidentranslokation aus zwei Chromosomen (RB') ein Chromatidbruch (B') und ein Isochromatidbruch (B'') zu erkennen. Die SU sind sowohl proximal als auch distal eingetreten.

Die Metaphase ist unvollständig.

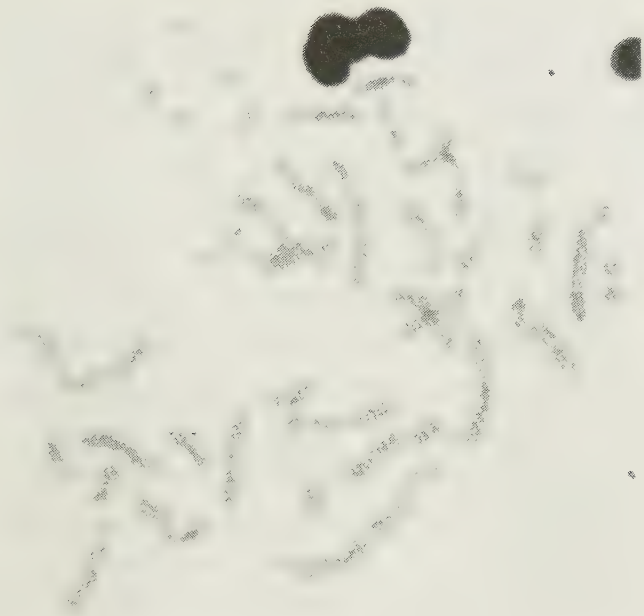


Abbildung 4.10

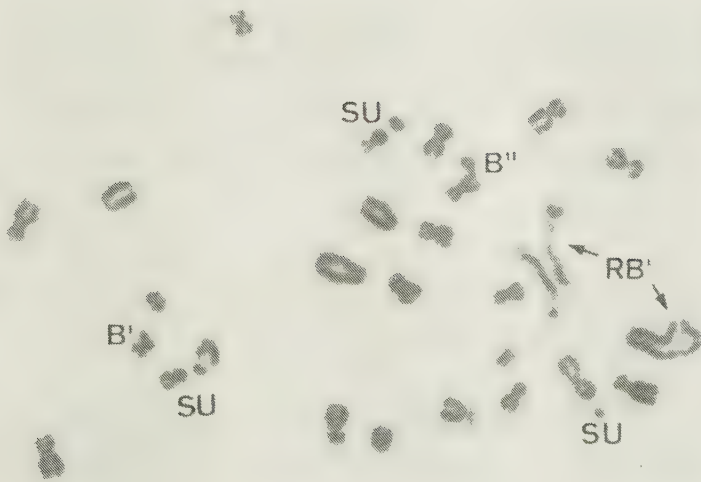


Abbildung 4.11

c) Subchromatidentranslokationen sind, soweit es die Struktur der DNS als solche betrifft, ebenfalls inter-, beziehungsweise intrachromosomale Chromatidenaustausche. Allerdings zeigen sie nicht die typische Konfiguration der RB' (Abb. 4.9).

Sub-RB' zwischen zwei Chromosomen traten in den Metaphasen als zueinanderhin orientierte "Knickstellen" in beiden beteiligten Chromatiden in Erscheinung. Diese sind über feine "Stränge" miteinander verbunden. Innerhalb eines Chromosoms auftretende sub-RB' waren an den, zwischen den Chromatiden (Anaphasespalt) sichtbaren Verbindungen zu erkennen. Auf den Präparaten erster Fixierungen (I) des G2-Bestrahlungsexperiments gelangten überwiegend jene Zellen zur Auswertung, die zur Zeit der Bestrahlung entweder bereits in die Prophase der Mitose eingetreten waren, oder diesem Schritt unmittelbar bevorstanden; hier wurden die meisten sub-RB' beobachtet.

Da die Chromosomen in der Prophase damit beginnen, sich durch Sprialisation und Fältelung aus ihrer aktiven Interphaseform in die Transportform (Anaphase) umzugestalten, liegt es nahe, einen Zusammenhang zwischen dem Kondensationsgrad des Chromatins der Chromosomen und der Konfiguration dieser Aberrationsform zu vermuten.

4.4.3 Achromatische Läsionen

Achromatische Läsionen (AL) sind als "Färbelücken" in der Längsstruktur der Chromatiden zu erkennen. Diese sogenannten "Gaps" treten unabhängig vom Zeitpunkt der Bestrahlung auf und

führen in der Anaphase der Mitose zu keinem Verlust chromosomalen Materials. Sie können, im Gegensatz zu Brüchen (B' und B"), nicht als eine echte Diskontinuität eines Chromosoms oder einer Chromatide angesehen werden. Wahrscheinlich sind sie auf eine, partiell unvollständige Kondensation des Chromatins zurückzuführen. Als achromatische Läsion wurde eine Aberration nur dann gewertet, wenn es in dieser Region zu keiner Abknickung oder Verlagerung der betroffenen Chromatide kam, und die gepaarten Chromatiden einschließlich der entstandenen Lücke die gleiche Länge besaßen (Abb. 4.9 und Abb. 4.10)).

5. QUANTITATIVE VERSUCHSERGEBNISSE

In diesem Teil meiner Arbeit sind die Auswertungsergebnisse in der Reihenfolge der Versuchsdurchführung (3.) beschrieben und in Tabellen, sowie zeichnerisch dargestellt.

Der besonderen Fragestellung der jeweiligen Untersuchung entsprechend wurden die im vorigen Kapitel (4.) dargestellten und erläuterten Parameter ausgewertet. Die Resultate wurden unter Anwendung geeigneter statistischer Methoden überprüft.

5.1. Die Analyse der Zellkinetik (A)

Anhand der markierungsabhängigen differentiellen Färbung der Metaphasechromosomen (4.3) wurde die Verteilung von ersten (M1), zweiten (M2) und weiteren Mitosen (M3) in Lymphozytenkulturen bestimmt. Dabei wurden alle Metaphasen gewertet, die mehr als die Hälfte des diploiden Chromosomensatzes aufwiesen. Außerdem wurde die spontane SCE-Rate in den Metaphasen der zweiten Mitose ermittelt, wofür jedoch ausschließlich vollständige Metaphasen ausgewählt wurden.

Die Resultate der Auswertung werden im Folgenden, nacheinander für die untersuchten Spezies, Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen beschrieben und am Schluß (5.1.5) dieses Abschnitts miteinander verglichen und graphisch dargestellt.

5.1.7 Mensch

Laut Versuchssplan 4 (3.2.) sollte die Kinetik der menschlichen Lymphozyten über den Kultivierungszeitraum zwischen 34 und 72 Stunden verfolgt werden. Wegen Stromausfalls während der Kultivierung mußte das Experiment bereits nach 54 Stunden abgebrochen werden. Trotzdem lieferte der Versuch Auswertungsergebnisse, die eine hinreichende Bestimmung der Zellzyklusdauer zulassen.

Aus Tabelle 5.1.1.1 ist zu entnehmen, daß die Häufigkeit der M1-Metaphasen bei den Spendern "Ma" und "Mb" in fast gleicher Weise abnimmt. Ab etwa der 40. Stunde sinkt sie innerhalb von 14 Stunden von 100 % auf ungefähr ein Viertel dieses Wertes. Im selben Zeitraum steigt die Zahl der M2-Metaphasen von Null auf mehr als zwei Drittel aller ausgewerteten Zellen an. Metaphasen dritter Mitosen treten nach 54 Stunden nur zu 5% auf. Bei beiden Spendern sind für die einzelnen Fixierungszeiten nahezu die gleichen Mitoseraten zu verzeichnen. Nach 34 bis 36 Stunden waren in der Lymphozyten des Spenders "Ma" gar keine und beim Spender "Mb" nur zögernd Metaphasen anzutreffen.

Tabelle 5.1.1.1

Die Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen (M1, M2 und M3) in Kulturen menschlicher Lymphozyten (Spender Ma und Mb) nach 34 bis 54 Stunden Kulturdauer, bei zweistündiger Fixierung

Kultur- dauer	Anzahl Metaphasen		M1		% Metaphasen		M3	
	Ma	Mb	Ma	Mb	Ma	Mb	Ma	Mb
34 h		18		100				
36 h		157		100				
38 h		200		100				
40 h	100	200	100	99,5		0,5		
42 h	100	200	95	93,5	5	6,5		
44 h	100	200	96	98	4	2		
46 h	100	200	84	82,5	15	17,5	1	
48 h	100	200	56	67,5	43	32	1	0,5
50 h	100	200	59	61,5	40	38,5	1	
52 h	100	200	39	38	59	61	2	1
54 h	100	200	26	27	69	68	5	5

Tabelle 5.1.1.2

Die Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen (M1, M2 und M3) in Kulturen menschlicher Lymphozyten (Spender Ma, Mb, Mc, Md und Me) nach 48, 62 und 72 Stunden Kulturdauer

Kultur- dauer	Spender	Anzahl Metaphasen	% Metaphasen		M3
			M1	M2	
48 h	Ma**	300	78,33	21,67	
	Ma*	100	56	43	1
	Mb*	200	67,5	32	0,5
	Mc	100	60	37	3
	Md	100	73	27	
	Me	100	51	46	3
	Mittelwerte: + SE	:	64,31 4,27	34,45 3,82	1,25 0,57
62 h	Ma***	200	25	62	13
72 h	Ma**	600	21,17	55,33	23,5
	Mc	150	12	27,33	60,67
	Mittelwerte: + SE	:	16,59 4,59	41,33 14	42,09 18,59

- * Zellkinetikexperiment (A) SE = mittlerer Fehler
 ** Bestrahlungsexperiment (B), Kontrollen
 *** dieser Versuch wurde nicht im Rahmen vorliegender Arbeit durchgeführt

Durch das Einbeziehen der Befunde aus der Voruntersuchung und den Kontrollen der Bestrahlungsexperimente (B) konnten die in diesem Experiment erarbeiteten Ergebnisse erweitert (48 h) und vervollständigt (62 und 72 h) werden. Tabelle 5.1.1.2 läßt erkennen, daß die Lymphozyten verschiedener Spender (Ma, Mb, Mc, Md und Me) nach 48 Stunden relativ große Unterschiede in ihrer Zellkinetik aufweisen. Diese kommen sehr deutlich zwischen den Spendern "Ma" und "Me" zum Ausdruck. M1-Metaphasen wurden zu 78,33 % (Ma) und 51 % (Me) beobachtet, M2-Metaphasen traten zwischen 21,67 % und 46 % auf, und M3-Metaphasen waren bis zu 3 % nachweisbar. Nach 72 Stunden Kulturdauer sind bei den Spendern "Ma" und "Mc" ebenfalls erhebliche Unterschiede bezüglich der Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen zu beobachten.

Ungeachtet der inter- und intraindividuellen Unterschiede, zu deren möglichen Ursachen im weiteren Verlauf dieses Kapitels noch Stellung genommen werden wird, sind die Einzelergebnisse in Tabelle 5.1.1.3 zusammengefaßt worden.

Danach ist bei einer Kultivierung zwischen 54 und 72 Stunden für die M1-Metaphasen nur ein Rückgang von 26,67 % auf 19,33 % zu verzeichnen. M2-Metaphasen, die nach 54 Stunden mit 68,33 % ihr Maximum erreicht zu haben scheinen, gehen auf den Wert von 49,73 % zurück. Im selben Zeitraum nehmen M3-Metaphasen von 5 % auf 30,93 % zu.

Tabelle 5.1.1.4 gibt für jede Fixierungszeit die Mittelwerte an, die aus den Ergebnissen der einzelnen Spender ($\pm$ SE) errechnet wurden.

Tabelle 5.1.1.3

Die Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen (M1, M2 und M3) in Kulturen menschlicher Lymphozyten nach 34 bis 54, sowie 62 und 72 Stunden Kulturdauer (zusammengefaßte Ergebnisse $\pm$ PE)

Kultur- dauer	Anzahl Metaphasen	% Metaphasen ($\pm$ PE)		
		M1	M2	M3
34 h	18	100 $\pm$ 23,6		
36 h	157	100 $\pm$ 7,98		
38 h	200	100 $\pm$ 7,07		
40 h	300	99,67 $\pm$ 5,76	0,33 $\pm$ 0,33	
42 h	300	94 $\pm$ 5,6	6 $\pm$ 0,71	
44 h	300	97,33 $\pm$ 5,69	2,67 $\pm$ 0,94	
46 h	300	83 $\pm$ 5,25	16,67 $\pm$ 2,35	0,33 $\pm$ 0,33
48 h	900	67,78 $\pm$ 2,74	31,33 $\pm$ 1,87	0,89 $\pm$ 0,31
50 h	300	60,67 $\pm$ 4,5	39 $\pm$ 3,61	0,33 $\pm$ 0,33
52 h	300	38,33 $\pm$ 3,57	60,33 $\pm$ 4,48	1,33 $\pm$ 0,67
54 h	300	26,67 $\pm$ 2,98	68,33 $\pm$ 4,77	5 $\pm$ 1,29
62 h	200	25 $\pm$ 3,54	62 $\pm$ 5,57	13 $\pm$ 2,55
72 h	750	19,33 $\pm$ 1,61	49,73 $\pm$ 2,57	30,93 $\pm$ 2,03

PE = Poisson Fehler

Tabelle 5.1.1.4

Die Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen (M1, M2 und M3) in Kulturen menschlicher Lymphozyten nach 34 bis 54, sowie 62 und 72 Stunden Kulturdauer (zusammengefaßte Ergebnisse $\pm$ SE)

Kultur- dauer	Anzahl Metaphasen	% Metaphasen ($\pm$ SE)		
		M1	M2	M3
34 h	18	100		
36 h	157	100		
38 h	200	100		
40 h	300	99,75 $\pm$ 0,25	0,25 $\pm$ 0,18	
42 h	300	94,25 $\pm$ 0,75	5,75 $\pm$ 0,75	
44 h	300	97 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	
46 h	300	83,25 $\pm$ 0,75	16,25 $\pm$ 1,25	0,5 $\pm$ 0,5
48 h	900	64,31 $\pm$ 4,27	34,45 $\pm$ 3,82	1,25 $\pm$ 0,57
50 h	300	60,25 $\pm$ 1,25	39,25 $\pm$ 0,75	0,5 $\pm$ 0,5
52 h	300	38,5 $\pm$ 0,5	60 $\pm$ 1	1,5 $\pm$ 0,5
54 h	300	26,5 $\pm$ 0,5	68,5 $\pm$ 0,5	5 $\pm$ 0
62 h	200	25	62	13
72 h	750	16,59 $\pm$ 4,59	41,33 $\pm$ 14	42,09 $\pm$ 18,6

SE = mittlerer Fehler

Tabelle 5.1.1.5

Die SCE-Raten in menschlichen Lymphozyten (Spender Ma und Mb) nach 46 bis 54, sowie 62 und 72 Stunden Kulturdauer

Kultur- dauer	Spender	Anzahl Zellen	SCE pro Zelle	
			Mittelwerte	+ SE Min - Max
46 h	Mb*	20	8,1	+ 0,94 3 - 20
48 h	Mb*	20	5,8	+ 0,65 2 - 13
50 h	Mb*	20	6,95	+ 0,79 2 - 15
52 h	Mb*	20	6,4	+ 0,6 2 - 11
54 h	Mb*	20	7,75	+ 0,96 1 - 16
48 h	Ma**	20	6,95	+ 0,85 1 - 16
62 h	Ma***	20	6,65	+ 0,6 1 - 14
72 h	Ma**	20	6,55	+ 0,62 1 - 12
gesamt Ma:		60	6,72	+ 0,12
gesamt Mb:		100	7	+ 0,42
insgesamt:		160	6,86	+ 0,14
* Zellkinetikexperiment (A) SE = mittlerer Fehler				
** Bestrahlungsexperiment (B), Kontrollen				
*** dieser Versuch wurde nicht im Rahmen vorliegender Arbeit durchgeführt.				

Zur Bestimmung der SCE-Rate in menschlichen Lymphozyten wurden je Fixierung 20 Metaphasen der zweiten Mitose ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Auswertung finden sich in Tabelle 5.1.1.5.

Innerhalb des Fixierungszeitraums von 46 bis 54 Stunden nach Ansatz der Kulturen wurden beim Spender "Mb" unterschiedliche SCE-Raten festgestellt. Sie bewegen sich zwischen 5,8 und 8,1 SCE pro Zelle. In den einzelnen Metaphasen wurden zwischen 1 und 20 SCEs beobachtet. Beim Spender "Ma" sind dagegen für die Fixierung nach 48, 62 und 72 Stunden Kulturdauer nur unwesentliche Abweichungen in den SCE-Raten festgestellt worden.

Die SCE-Zahl in den einzelnen Zellen schwankte zwischen 1 und 16. Die gemittelte SCE-Rate beträgt $6,72 \pm 0,14$ pro Zelle.

Alle zwischen den Einzelergebnissen auftretenden Unterschiede

liegen innerhalb der Grenzen ihrer mittleren Fehler ($\pm$ SE). Für beide Spender (Ma und Mb) ist eine durchschnittliche Rate von 6,86 SCE pro Zelle $\pm$ 0,12 zu verzeichnen.

In 160 ausgewerteten M2-Metaphasen wurden insgesamt 1103 SCEs analysiert.

5.1.2 Schimpanse

Gemäß Versuchsplan A (3.2) wurde das Auftreten erster, zweiter und weiterer Mitosen in den Lymphozyten zweier Spender (Ca und Cb) zwischen 32 und 70 Stunden Kulturdauer untersucht. Tabelle 5.1.2.1 zeigt die Auswertungsergebnisse dieser Untersuchung. Es sind deutliche Unterschiede in der Zellkinetik der beiden Spender zu erkennen. Für "Ca" ist nach der 40. Stunde, verglichen mit "Cb", ein schnelleres Abnehmen der M1-, sowie ein stärkerer Anstieg der M2- und M3-Metaphasen zu beobachten. Die Unterschiede zwischen den beiden Spendern erreichen Werte bis zu 24,5 % (46 h). Bereits 34 Stunden nach Ansatz der Kulturen treten bei beiden Spendern Metaphasen zweiter Mitosen auf, die nach 56 Stunden für "Ca" mit 42 % und für "Cb" mit 56 % ihr Maximum erreichen. Von der 38. bis zur 70. Stunde steigen die M3-Metaphasen auf Werte von 69 % für "Ca" und 50 % für "Cb" an. Die Einzelergebnisse für "Ca" und "Cb" sind in Tabelle 5.1.2.2 ($\pm$ PE) zusammengefaßt.

In Tabelle 5.1.2.3 werden die errechneten Mittelwerte aus "Ca" und "Cb" mit ihren entsprechenden Fehlern ($\pm$ SE) angegeben.

Tabelle 5.1.2.1

Die Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen (M1, M2 und M3) in Kulturen von Schimpansenlymphozyten nach 32 bis 70 Stunden Kulturdauer, bei zweistündiger Fixierung (Spender Ca und Cb)

Kultur- dauer	Anzahl Metaphasen		M1		% Metaphasen M2		M3	
	Ca	Cb	Ca	Cb	Ca	Cb	Ca	Cb
32 h	40	60	100	100				
34 h	200	200	97,5	97	2,5	3		
36 h*								
38 h	200	*	92		7,5		0,5	
40 h	200	200	72	88,5	28	11		0,5
42 h	200	200	68	85	32	14		1
44 h	100	200	68	84	29	15,5	3	0,5
46 h	200	200	56	75,5	40,5	21,5	3,5	3
48 h	200	200	57	69,5	34,5	27	8,5	3,5
50 h	200	200	35,5	60	40,5	35	24	5
52 h	*	200		38,5		54,5		7
54 h	200	200	35	32	33,5	45	31,5	23
56 h	100	200	28	20	42	56	30	24
58 h*								
60 h	200	200	28	26,5	31	42,5	41	31
62 h	200	200	37	18	30	37	33	45
64 h	300	200	18,67	22	31	40,5	50,33	37,5
66 h	300	200	31,33	24	28,5	39,5	40,33	31,5
68 h*								
70 h	200	200	15	11,5	16	39,5	69	50

*ausgefallen

Tabelle 5.1.2.2

Die Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen (M1, M2 und M3) in den Kulturen von Schimpansenlymphozyten nach 32 bis 70 Stunden Kulturdauer, bei zweistündiger Fixierung ((Ca+Cb) + PE)

Kultur- dauer	Anzahl Metaphasen	% Metaphasen (+ PE)		
		M1	M2	M3
32 h	100	100 + 10		
34 h	400	97,25 + 4,93	2,75 + 0,83	
38 h	200	92 + 6,78	7,5 + 1,94	0,5 + 0,5
40 h	400	80,25 + 4,48	19,5 + 2,21	0,25 + 0,25
42 h	400	76,5 + 4,37	23 + 2,39	0,5 + 0,35
44 h	300	78,67 + 5,12	20 + 2,58	1,33 + 0,67
46 h	400	65,75 + 4,05	31 + 2,78	3,25 + 0,9
48 h	400	63,25 + 3,98	30,75 + 2,77	6 + 1,22
50 h	400	47,75 + 3,46	37,75 + 3,07	14,5 + 1,9
52 h	200	38,5 + 4,39	54,5 + 5,22	7 + 1,87
54 h	400	33,5 + 2,89	39,25 + 3,13	27,25 + 2,61
56 h	300	22,67 + 2,74	51,33 + 4,13	26 + 2,94
60 h	400	27,25 + 2,61	36,75 + 3,03	36 + 3
62 h	400	27,5 + 2,62	33,5 + 2,89	39 + 3,12
64 h	500	20 + 2,24	34,8 + 2,64	45,2 + 3,01
66 h	500	28,4 + 2,38	32,8 + 2,56	36,8 + 2,71
70 h	400	13,25 + 1,82	27,75 + 2,63	59,5 + 3,85

PE = Poisson Fehler

Tabelle 5.1.2.3

Die Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen (M1, M2 und M3) in den Kulturen von Schimpansenlymphozyten nach 32 bis 70 Stunden Kulturdauer, bei zweistündiger Fixierung (Mittelwert $\pm$ SE)

Kultur- dauer	Anzahl Metaphasen	% Metaphasen ($\pm$ SE)		
		M1	M2	M3
32 h	100	100		
34 h	400	97,25 $\pm$ 0,25	2,75 $\pm$ 0,25	
38 h	200	92	7,5	0,5
40 h	400	80,25 $\pm$ 0,25	19,5 $\pm$ 6,5	0,25 $\pm$ 0,25
42 h	400	76,5 $\pm$ 8,5	23 $\pm$ 9	0,5 $\pm$ 0,5
44 h	300	76 $\pm$ 8	22,25 $\pm$ 6,75	1,75 $\pm$ 1,25
46 h	400	65,75 $\pm$ 9,75	31 $\pm$ 9,5	3,25 $\pm$ 0,25
48 h	400	63,25 $\pm$ 6,25	30,75 $\pm$ 3,75	6 $\pm$ 2,5
50 h	400	47,75 $\pm$ 12,3	37,75 $\pm$ 2,75	14,5 $\pm$ 9,5
52 h	200	38,5	54,5	7
54 h	400	33,5 $\pm$ 1,5	39,25 $\pm$ 5,75	27,25 $\pm$ 4,25
56 h	300	24 $\pm$ 4	49 $\pm$ 7	27 $\pm$ 3
60 h	400	27,25 $\pm$ 0,75	36,75 $\pm$ 5,75	36 $\pm$ 5
62 h	400	27,5 $\pm$ 9,5	33,5 $\pm$ 3,5	39 $\pm$ 6
64 h	500	20,34 $\pm$ 1,67	35,75 $\pm$ 4,75	43,92 $\pm$ 6,42
66 h	500	27,67 $\pm$ 3,67	33,92 $\pm$ 5,59	35,92 $\pm$ 4,42
70 h	400	13,25 $\pm$ 1,75	27,75 $\pm$ 11,8	59,5 $\pm$ 9,5

SE = mittlerer Fehler

Tabelle 5.1.2.4

Die SCE-Raten in Schimpansenlymphozyten (Ca) nach 48, sowie 64 und 70 Stunden Kulturdauer

Kultur- dauer	Anzahl Zellen	SCE pro Zelle	
		Mittelwerte $\pm$ SE	Min - Max
48 h*	25	5,28 $\pm$ 0,66	1 - 16
48 h**	45	4,64 $\pm$ 0,38	0 - 13
64 h*	20	5,6 $\pm$ 0,64	1 - 14
70 h*	20	5,3 $\pm$ 0,72	0 - 12
insgesamt :	110	5,21 $\pm$ 0,18	

* Zellkinetikexperiment (A)

SE = mittlerer Fehler

** Bestrahlungsexperiment (B)
(Kontrolle)

Die Ergebnisse der Auswertung der SCEs sind in Tabelle 5.1.2.4 dargestellt. Die M2-Metaphasen der Lymphozyten des Schimpanse "Ca" zeigen keine Unterschiede in ihren SCE-Raten, die von der Kulturdauer abhängig sind. Pro Zelle wurden zwischen Null und 16 SCEs beobachtet. In den 110 ausgewerteten Zellen treten 558 SCEs auf. Die durchschnittliche Rate liegt bei $5,21 \pm 0,18$ SCE pro Zelle ($\pm$ SE).

5.1.3 Schwein

Die Vorversuche mit Schweineblut hatten bereits gezeigt, daß sich nach 48 Stunden mehr als die Hälfte der Lymphozyten in der dritten, etwa ein Drittel der Zellen in der zweiten und weniger als ein Zehntel in der ersten Mitose befanden.

Diesem Befund konnte sowohl eine hohe Teilungsgeschwindigkeit als auch eine kurze Stimulationsperiode und damit frühe G0-G1 Transformation der Zellen zugrundeliegen. Deshalb wurde schon 26 Stunden nach Ansatz des Zellkinetikexperiments (vergl. Versuchsplan A) damit begonnen die Kulturen aufzuarbeiten. Eine Weiterführung dieses Experiments über die Kulturdauer von 48 Stunden hinaus war aufgrund der Vor Versuchsergebnisse nicht mehr erforderlich, da eine grundsätzliche Änderung der drei auswertbaren Parameter (M1, M2 und M3) kaum zu erwarten war. Diese Erwartung wurde durch das Experiment bestätigt. Tabelle 5.1.3.1 läßt erkennen, daß bei den drei untersuchten Tieren (Pa, Pb und Pc) eine ähnliche Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen in den Lymphozytenkulturen anzutreffen ist.

Tabelle 5.1.3.1

Die Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen (M1, M2 und M3) in Schweinelymphozytenkulturen nach 26 bis 48 Stunden Kulturdauer (Spender Pa, Pb und Pc), bei zweistündiger Fixierung)

Kultur- dauer	Anzahl Metaphasen in								
	M1			M2			M3		
	Pa	Pb	Pc	Pa	Pb	Pc	Pa	Pb	Pc
26 h	92	97	98	8	3	2			
28 h	98	98	95	2	2	5			
30 h	94	96	95	6	4	5			
32 h	88	92	81	11	7	18	1	1	1
34 h*									
36 h	67	59	63	31	39	34	2	3	3
38 h	* 46	*	*	* 48	*	*	* 6	*	*
40 h	40	48	39	53	49	54	7	3	7
42 h	* 41	*	*	* 53	*	*	* 6	*	*
44 h	21	32	37	45	44	36	34	24	27
46 h	8	14	*	35	35	*	57	51	*
48 h	10	9	9	27	39	32	63	52	59

* ausgefallen

Tabelle 5.1.3.2

Die Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen (M1, M2 und M3) in Schweinelymphozytenkulturen nach 26 bis 48 Stunden Kulturdauer bei zweistündiger Fixierung ((Pa+Pb+Pc) $\pm$ PE)

Kultur- dauer	Anzahl Metaphasen	% Metaphasen ($\pm$ PE)					
		M1		M2		M3	
26 h	300	95,67	$\pm$ 5,64	4,33	$\pm$ 1,2		
28 h	300	97	$\pm$ 5,69	3	$\pm$ 1		
30 h	300	95	$\pm$ 5,63	5	$\pm$ 1,29		
32 h	300	87	$\pm$ 5,39	12	$\pm$ 2	1	$\pm$ 0,58
36 h	300	63	$\pm$ 4,58	34,67	$\pm$ 3,4	2,67	$\pm$ 0,94
38 h	100	46	$\pm$ 6,78	48	$\pm$ 6,93	6	$\pm$ 2,45
40 h	300	42,33	$\pm$ 3,76	52	$\pm$ 4,16	5,67	$\pm$ 1,37
42 h	100	41	$\pm$ 6,4	53	$\pm$ 7,28	6	$\pm$ 2,45
44 h	300	30	$\pm$ 3,16	41,67	$\pm$ 3,73	28,33	$\pm$ 3,07
46 h	200	11	$\pm$ 2,35	35	$\pm$ 4,18	54	$\pm$ 5,2
48 h	400	9,33	$\pm$ 1,76	32,67	$\pm$ 3,3	58	$\pm$ 4,4

PE = Poisson Fehler

Tabelle 5.1.3.3

Die Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen (M1, M2 und M3) in Schweinelymphozytenkulturen nach 26 bis 48 Stunden Kulturdauer bei zweistündiger Fixierung (Mittelwert $\pm$ SE)

Kultur- dauer	Anzahl Metaphasen	% Metaphasen ($\pm$ SE)		
		M1	M2	M3
26 h	300	95,67 $\pm$ 1,86	4,33 $\pm$ 1,86	
28 h	300	97 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	
30 h	300	95 $\pm$ 0,57	5 $\pm$ 0,57	
32 h	300	87 $\pm$ 3,21	12 $\pm$ 3,21	1 $\pm$ 0
36 h	300	63 $\pm$ 2,31	34,67 $\pm$ 2,33	2,67 $\pm$ 0,33
38 h	100	46	48	6
40 h	300	42,33 $\pm$ 2,84	52 $\pm$ 1,53	5,67 $\pm$ 1,33
42 h	100	41	53	6
44 h	300	30 $\pm$ 4,72	41,67 $\pm$ 2,84	28,33 $\pm$ 2,96
46 h	200	11 $\pm$ 3	35 $\pm$ 0	54 $\pm$ 3
48 h	400	9,33 $\pm$ 0,33	32,67 $\pm$ 3,48	58 $\pm$ 3,21

SE = mittlerer Fehler

Bei allen Spendern treten bereits nach 26 Stunden Kulturdauer zweite und nach 32 Stunden die ersten dritten Mitosen auf. M1-Metaphasen sinken innerhalb des Fixierungszeitraums von nahezu 100 % auf Werte um 10 % ab. M2-Metaphasen gehen, nachdem sie zwischen 40 und 42 Stunden ihr Maximum mit ungefähr 50 % erreicht haben, auf Werte zwischen 39 und 27 % zurück. In der Zeit zwischen der 32. und 48. Stunde steigen M3-Metaphasen auf Werte von 63 % (Pa), 52 % (Pb) und 59 % (Pc) an.

In Tabelle 5.1.3.2 sind die zusammengefaßten Einzelergebnisse mit ihren natürlichen Fehlern ($\pm$ PE) und in Tabelle 5.1.3.3 die daraus errechneten Mittelwerte mit ihren mittleren Fehlern ($\pm$ SE) verzeichnet.

Tabelle 5.1.3.4a

Die SCE-Raten in Schweinelymphozyten (Pa, Pb und Pc) nach 26 bis 48 Stunden Kulturdauer

Kultur- dauer	Spender	Anzahl Zellen	SCE pro Zelle Mittelwerte + SE	Min - Max
26-30 h	Pa	16	5,25 + 0,37	3 - 7
	Pb	10	5,4 + 0,61	3 - 9
	Pc	11	5,18 + 0,82	0 - 10
	insgesamt:	37	5,27 + 0,06	
32-36 h	Pa	42	5,12 + 0,37	1 - 13
	Pb	46	5,91 + 0,35	1 - 14
	Pc	52	5,63 + 0,32	1 - 14
	insgesamt:	140	5,55 + 0,32	
38-40 h	Pa	53	5,45 + 0,28	2 - 12
	Pb	99	5,99 + 0,32	0 - 19
	Pc	54	5,03 + 0,36	0 - 12
	insgesamt:	206	5,49 + 0,28	
42-44 h	Pa	45	5,35 + 0,34	1 - 11
	Pb	94	6,02 + 0,27	1 - 14
	Pc	36	6,08 + 0,4	1 - 13
	insgesamt:	175	5,82 + 0,23	
46-48 h	Pa	62	5,64 + 0,3	1 - 11
	Pb	74	5,8 + 0,29	2 - 13
	Pc	32	5,69 + 0,51	1 - 14
	insgesamt:	168	5,71 + 0,05	

SE = mittlerer Fehler

Tabelle 5.1.3.4b

Die SCE-Raten in Schweinelymphozyten (Pa, Pb und Pc) nach 26 bis 48 Stunden Kulturdauer

Kultur- dauer	Spender	Anzahl Zellen	SCE pro Zelle Mittelwerte + SE	Min - Max
26-48 h	Pa	218	5,36 + 0,09	1 - 13
	Pb	323	5,82 + 0,11	0 - 19
	Pc	185	5,52 + 0,19	0 - 14
	insgesamt:	726	5,56 + 0,13	

SE = mittlerer Fehler

Wie aus den Tabellen 5.1.3.4a und b zu ersehen ist, treten in den Lymphzyten der untersuchten Spender "Pa", "Pb" und "Pc" SCEs mit einer Häufigkeit zwischen Null und 19 pro Zelle auf. Für die Fixierungszeiträume 26-30, 32-36, 38-40, 42-44 und 46-48 Stunden sind in den Zellen von "Pa", "Pb" und "Pc" SCE-Raten zwischen durchschnittlich 5,03 und 6,08 pro Zelle beobachtet worden. Sowohl die inter- als auch die intra-individuellen Unterschiede sind kleiner als die errechneten mittleren Fehler ($\pm$ SE). Gemittelt ergibt sich eine SCE-Rate von $5,56 \pm 0,13$. In 726 ausgewerteten M2-Metaphasen wurden insgesamt 4116 SCEs analysiert.

5.1.4 Kaninchen

An den Lymphozyten des Kaninchens wurde kein Experiment zur Analyse der Zellkinetik durchgeführt, und die Präparate aus den Vorversuchen lieferten wegen zu geringer Mitoseraten (4.1) keine brauchbaren Ergebnisse. Es stehen somit lediglich die Resultate aus den Kontrollen der Bestrahlungsexperimente (8) zur Verfügung (Tabelle 5.1.4.1). Nach 32 Stunden Kulturdauer sind keine nennenswerten interindividuellen Unterschiede zu beobachten.

Tabelle 5.1.4.1

Die Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen (M1, M2 und M3) in Kaninchenlymphozytenkulturen (Spender Ra, Rc, Rd, Re und Rf) nach 32, 42 und 48 Stunden Kulturdauer

Kultur- dauer	Spender	Anzahl Metaphasen	M1	% Metaphasen M2	M3
32 h	Re*	200	85	13,5	1,5
	Rf*	177	83,6	15,8	0,6
	Mittelwerte:		84,3	14,65	1,05
	+ SE :		0,7	1,15	0,45
42 h	Ra	200	53	35,5	11
	Rc	200	51,5	40	8,5
	Mittelwerte:		52,25	37,75	9,75
	+ SE :		0,75	2,25	1,25
48 h	Rc	200	37	41	22
	Rd	200	23,5	34	42,5
	Mittelwerte:		30,25	37,5	32,25
	+ SE :		6,75	7,5	10,25

* diese Versuche wurden nicht im Rahmen vorliegender Arbeit durchgeführt. SE = mittlerer Fehler

Tabelle 5.1.4.2

Die Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen (M1, M2 und M3) in Kulturen bestrahlter Kaninchenlymphozyten (200 rad in G0) nach 32 bis 56 Stunden Kulturdauer und bei vierstündiger Fixierung [Fabry und Léonard, 1979]

Kultur- dauer	Anzahl* Metaphasen	M1	% Metaphasen (+ SE) M2	M3
32 h	400	94,25 + 0,63	5,75 + 0,63	
36 h	300	86,67 + 2,85	13,33 + 2,85	
40 h	200	63,5 + 3,5	35 + 2	1,5 + 1,5
44 h	100	40 + 0	49 + 0	11 + 0
48 h	400	26,75 + 2,63	45 + 2,48	28,25 + 1,93
52 h	400	15 + 2,16	35,5 + 0,96	50,5 + 2,06
56 h	400	16,5 + 1,5	21,5 + 0,5	62 + 1

* 100 Metaphasen pro Spender SE = mittlerer Fehler

Gemittelt traten 84,3 % M1-, 14,65 % M2- und 1,05 % M3-Metaphasen auf. Zwischen den Spendern "Ra" und "Rc" sind nach 42 Stunden ebenfalls nur geringe Differenzen zu verzeichnen. Die M1-Metaphasen sinken auf durchschnittlich 52,25 % ab, während M2-Metaphasen auf 37,75 % und M3-Metaphasen auf 9,75 % ansteigen. Nach 48 Stunden sind zwischen den Spendern "Rc" und "Rd" deutliche Unterschiede festzustellen, die in relativ großen Fehlern ($\pm$ SE) bei den Mittelwerten zum Ausdruck kommen.

M2-Metaphasen stellen mit $37,5 \pm 6,75$ % den größten Anteil der Zellen dar, gefolgt von M3-Metaphasen mit $32,25 \pm 7,5$ % und M1-Metaphasen mit $30,25 \pm 10,25$ %.

In Tabelle 5.1.4.3 werden die Ergebnisse der drei Fixierungen mit den entsprechenden, von Fabry und Léonard [1979] gefundenen Resultaten verglichen, die in Tabelle 5.1.4.2 aufgezeigt sind. Zu den Ergebnissen der im Rahmen vorliegender Arbeit erbrachten Ergebnissen ist eine gute Übereinstimmung festzustellen. Die Raten aufeinanderfolgender Mitosen in den Kontrollen weichen von den Kulturen der mit 200 rad bestrahlten Lymphozyten ab und lassen eine verzögernde Wirkung von Röntgenstrahlen auf den Zellzyklus erkennen.

Tabelle 5.1.4.4 zeigt die in den Kontrollen der Bestrahlungsexperimente gefundenen SCE-Raten. In den Lymphozyten der Spender "Ra", "Rc", "Re" und "Rf" waren in den Metaphasen zweiter Mitosen nach Kulturansatz zwischen Null und 13 SCEs beobachtet worden. Die zwischen den verschiedenen Spendern und für die verschiedenen Fixierungszeiten festgestellten Unterschiede in den SCE-Raten sind kleiner als ihre mittleren Fehler ($\pm$ SE). Die gemittelte SCE-Rate liegt bei $4,27 \pm 0,19$ pro Zelle.

Tabelle 5.1.4.3

Die Verteilung aufeinanderfolgender Mitosen (M1, M2 und M3) in Kaninchenlymphozytenkulturen nach 32, 40, 42, 44 und 48 Stunden Kulturdauer

Kultur- dauer	Anzahl Metaphasen	% Metaphasen ($\pm$ SE)		
		M1	M2	M3
32 h*	400	94,25 $\pm$ 0,63	5,75 $\pm$ 0,63	
32 h	377	84,3 $\pm$ 0,7	14,65 $\pm$ 1,15	1,05 $\pm$ 0,45
40 h*	200	63,5 $\pm$ 3,5	35 $\pm$ 2	1,5 $\pm$ 1,5
42 h	400	52,25 $\pm$ 0,75	37,75 $\pm$ 2,25	9,75 $\pm$ 1,25
42 h**	200	56 $\pm$ 3	33,25 $\pm$ 0,25	10,75 $\pm$ 2,75
44 h*	100	40 $\pm$ 0	49 $\pm$ 0	11 $\pm$ 0
48 h	400	30,25 $\pm$ 6,75	37,5 $\pm$ 7,5	32,25 $\pm$ 10,25
48 h*	400	26,75 $\pm$ 2,63	45 $\pm$ 2,48	28,45 $\pm$ 1,93
48 h***	200	37 $\pm$ 5	30 $\pm$ 4	28 $\pm$ 4

* bestrahlt mit 200 rad
[Fabry und Léonard, 1979]

** Ra + Rc, 200 rad

*** Rc, 200 rad

SE = mittlerer Fehler

Tabelle 5.1.4.4

Die SCE-Raten in Kaninchenlymphozyten (Ra, Rc, Re und Rf) nach 32, 42 und 48 Stunden Kulturdauer

Kultur- dauer	Spender	Anzahl Zellen	SCE pro Zelle	
			Mittelwerte $\pm$ SE	Min - Max
32 h	Re*	20	4,30 $\pm$ 0,54	0 - 10
32 h	Rf*	15	3,73 $\pm$ 0,71	0 - 10
42 h	Ra	42	4,64 $\pm$ 0,41	1 - 13
48 h	Rc	20	4,4 $\pm$ 0,62	1 - 11
insgesamt :		97	4,27 $\pm$ 0,19	

* diese Versuche wurden nicht
im Rahmen vorliegender Arbeit
durchgeführt.

SE = mittlerer Fehler

5.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse (A)

Die Ergebnisse der Zellkinetikanalysen der Lymphozyten von Mensch, Schimpanse, Schwein und vom Kaninchen sind in den Tabellen 5.1.1.4, 5.1.2.3, 5.1.3.3 und 5.1.4.2 zusammengefaßt. Die daraus berechneten Kurven sind in den Abbildungen 5.1.5.1, 5.1.5.2, 5.1.5.3 und 5.1.5.4 graphisch dargestellt. Darin sind die Abnahme der M1-, der Anstieg und Rückgang der M2- und die Zunahme der M3-Metaphasen prozentual gegenüber dem jeweiligen Fixierungszeitraum aufgetragen.

Ein interspezifischer Vergleich macht erhebliche Abweichungen in der Zellkinetik deutlich. Dabei sind sowohl Unterschiede in der Stimulation (G0-G1-Transformation) als auch in der Dauer des Zellzyklus zu erkennen. Während beim Menschen erste Metaphasen erst nach 34 und beim Schimpansen und Kaninchen nach 32 Stunden Kulturdauer zu beobachten waren, traten in den Lymphozyten des Schweins bereits 26 Stunden nach Kulturansatz Metaphasen in zweiter Mitose auf. Aus diesen Umständen kann gefolgert werden, daß die Zeit bis zur ersten Mitose bei Schweinelymphozyten weniger als 20 Stunden beträgt, wohingegen für menschliche Lymphozyten etwa 30 Stunden anzunehmen sind.

Die Häufigkeitsänderung der M2-Metaphasen ist als GAUSS'sche Normalverteilung dargestellt. Die Häufigkeit erster und dritter Mitosen nimmt nach einer logistischen Funktion ab, beziehungsweise zu.

Abbildungen 5.1.5.1, 5.1.5.2, 5.1.5.3 und 5.1.5.4

Die Häufigkeitsverteilung (% Metaphasen) erster, zweiter und weiterer Mitosen (M1, M2, und M3) in Lymphozyten von Mensch (MAN, Abb. 5.1.5.1), Schimpanse (CHIMPANZEE, Abb. 5.1.5.2), Schwein (PIG, Abb. 5.1.5.3) und Kaninchen (RABBIT, Abb. 5.1.5.4) in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Die Funktion (GAUSS'sche Normalverteilung) für die Häufigkeitsänderung der M2-Metaphasen lautet:

$$Y = a \cdot e^{\frac{-(T-b)^2}{c}}$$

Darin bedeuten:

Y	die Häufigkeit der M2-Metaphasen
T	die Zeit
a	die maximale Häufigkeit
b	der Zeitpunkt für a (T(a)) und
c	die Streubreite der Funktion

Die logistischen Verteilungskurven der M1- und M3-Metaphasen sind definiert durch die Formel:

$$Y = \frac{1}{\log 1 + e^{a(\log b - \log T)}}$$

Darin bedeuten:

Y	die Häufigkeit der M1- und M3-Metaphasen
T	die Zeit
a	der Zeitpunkt mittlerer Häufigkeit, = T(50 % M1-, bzw. M3-Metaphasen) und
b	die Steigung der Funktion im jeweiligen Kurvenpunkt.

Auf der Ordinate (Y) sind die Anzahlen der Metaphasen erster, zweiter und weiterer Mitosen (M1, M2 und M3) in % angegeben. Die Werte auf der Abszisse geben die Kulturdauer (TIME = T) in Stunden (HRS) an.

MAN

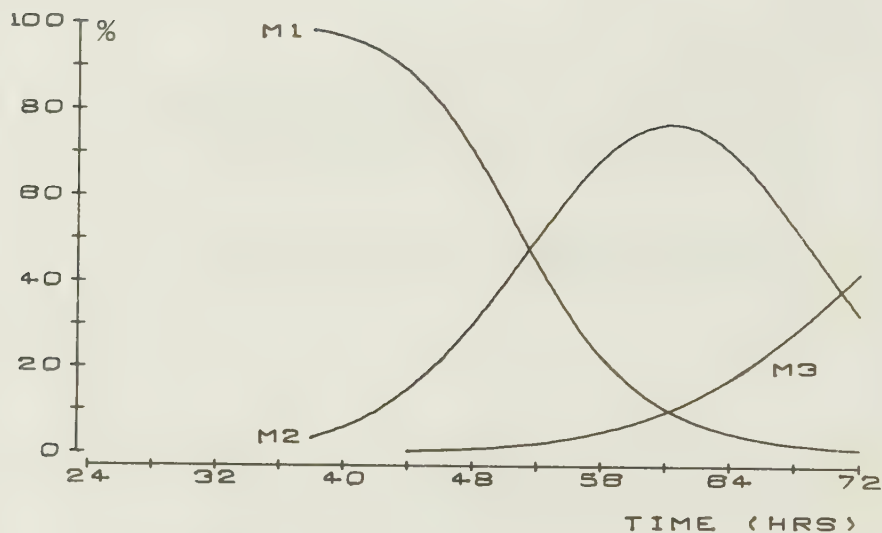


Abbildung 5.1.5.1

CHIMPANZEE

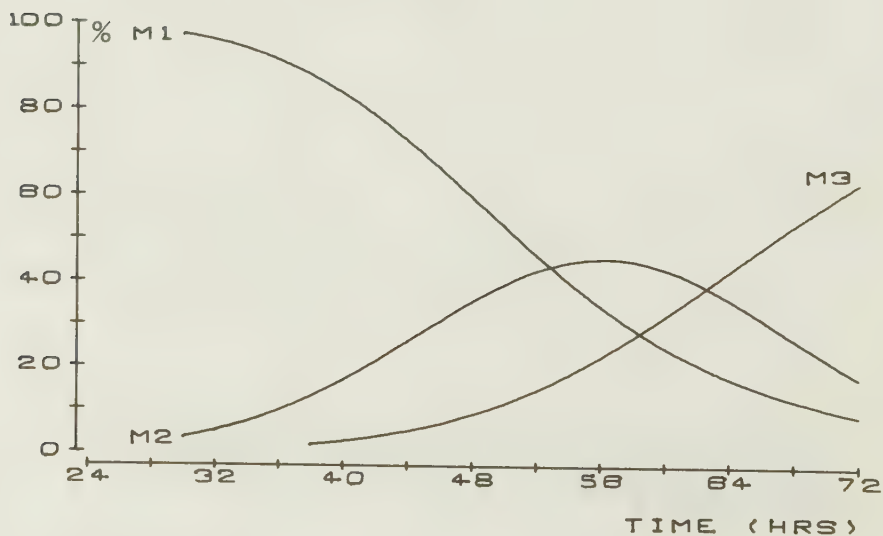


Abbildung 5.1.5.2

PIG

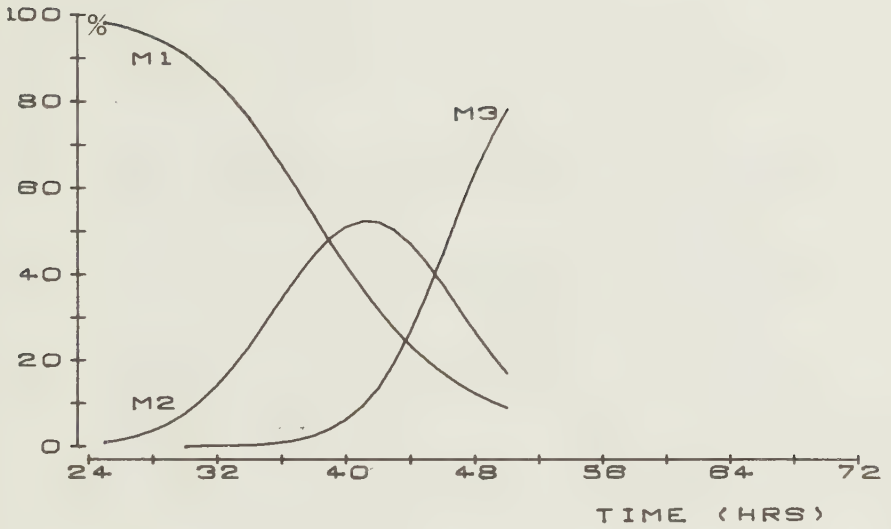


Abbildung 5.1.5.3

RABBIT

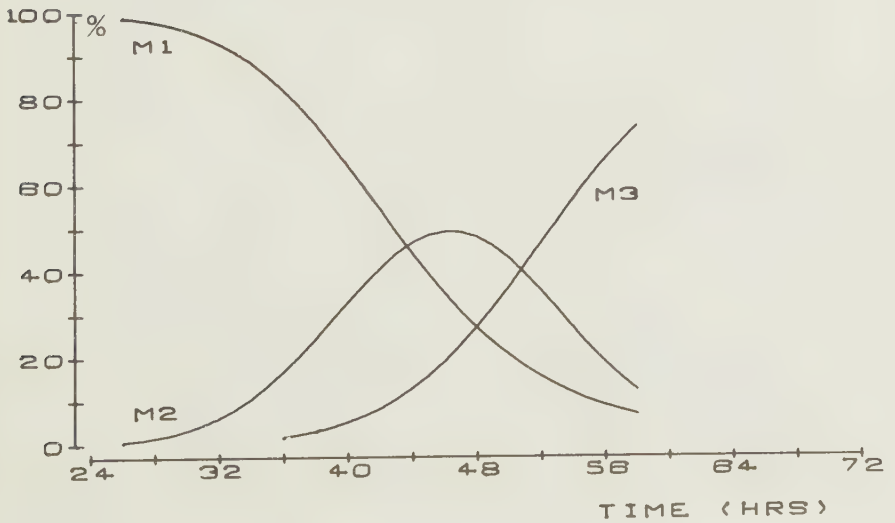


Abbildung 5.1.5.4

Die Dauer des zweiten Zellzyklus kann definiert werden als der zeitliche Abstand zwischen der zweiten und der dritten Mitose, der in den Abbildungen 5.1.5.1, 5.1.5.2, 5.1.5.3 und 5.1.5.4 durch den abschnittsweise parallelen Verlauf der Kurven für M2- und M3-Metaphasen dargestellt ist. Danach läßt sich für menschliche Lymphozyten ein Zeitraum von etwa 23 Stunden für die Dauer eines Zellzyklus abschätzen. Für die Lymphozyten des Schimpansen kann eine Zellzyklusdauer zwischen 13 und 16 Stunden angegeben werden. Bei Kaninchen und Schwein können gleiche Mitoseintervalle zwischen 8 und 11 Stunden festgestellt werden. Eine exaktere Angabe der Dauer der Zellzyklen ist aufgrund des methodischen Ansatzes der Untersuchung jedoch nicht möglich.

In Tabelle 5.1.5.1 sind die wesentlichen Merkmale für eine Charakterisierung der Zellkinetik zusammengefaßt. Als Maß für die Geschwindigkeit der Zellkinetik wurde der Zeitpunkt des Erreichens von 50 % M3-Metaphasen in den Kulturen zugrundegelegt.

In Tabelle 5.1.5.2 sind die für den Verlauf der Kurven maßgeblichen Parameter verzeichnet.

Die bei den einzelnen Spezies beobachteten SCE-Raten sind in Tabelle 5.1.5.3 zusammen mit ihren mittleren Fehlern ($\pm$ SE) enthalten. Sie sind in ihrer Größenordnung etwa gleich und liegen durchschnittlich zwischen 6,86 (beim Mensch) und 4,27 SCE pro Zelle (beim Kaninchen).

Tabelle 5.1.5.1

Die unterschiedliche Dauer der Zellzyklen in den Lymphozyten verschiedener Spezies (geschätzte Werte)

Spezies	erster Zellzyklus	zweiter Zellzyklus	Geschwindigkeit der Zellkinetik*
Mensch	> 30 h	23 h	74 h
Schimpanse	> 30 h	13 - 16 h	67 h
Schwein	< 20 h	8 - 11 h	46 h
Kaninchen	< 20 h	8 - 11 h	53 h

* T(50 % M3-Metaphasen)

Tabelle 5.1.5.2

Die, die Häufigkeiten aufeinanderfolgender Mitosen (M1, M2 und M3) bestimmenden Parameter (+ SE = mittlerer Fehler)

Parameter	Mensch	Schimpanse	Schwein	Kaninchen
M1: a	51,1 $\pm$ 0,7	50,8 $\pm$ 0,6	38,6 $\pm$ 0,4	42,8 $\pm$ 0,5
b	13,6 $\pm$ 2,9	6,7 $\pm$ 0,6	9,0 $\pm$ 1,0	8,8 $\pm$ 0,8
M2: a	76,4 $\pm$ 7,9	45,3 $\pm$ 2,6	52,5 $\pm$ 2,0	49,3 $\pm$ 2,2
b	60,2 $\pm$ 1,0	56,2 $\pm$ 0,8	41,3 $\pm$ 0,3	46,3 $\pm$ 0,4
c	160,2 $\pm$ 34,3	265,1 $\pm$ 48,2	66,4 $\pm$ 7,8	98,2 $\pm$ 11,2
M3: a	74,2 $\pm$ 0,3	66,7 $\pm$ 1,1	46,5 $\pm$ 0,4	52,7 $\pm$ 0,5
b	10,5 $\pm$ 0,5	7,1 $\pm$ 0,8	18,0 $\pm$ 2,9	10,6 $\pm$ 1,2

Darin bedeuten
für M2:

für M1 und M3:

a	die maximale Häufigkeit	a	der Zeitpunkt für die mittlere Häufigkeit
b	Zeitpunkt für a (T(a))		= T(50 % M1, bzw. M3)
c	die Streubreite der Funktion	b	die Steigung der Funktion im jeweiligen Kurvenpunkt

Tabelle 5.1.5.3

Die SCE-Raten in Lymphozyten von Mensch,
Schimpanse, Schwein und Kaninchen

Spezies	SCE pro Zelle Mittelwert $\pm$ SE
Mensch	6,86 $\pm$ 0,14
Schimpanse	5,21 $\pm$ 0,18
Schwein	5,56 $\pm$ 0,13
Kaninchen	4,27 $\pm$ 0,19

SE = mittlerer Fehler

5.2 Die Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten während der G₀-Phase (B)

Die Auswertung strahleninduzierter Aberrationen (2.5) erfolgte ausschließlich an vollständigen Metaphasen. Es wurden Metaphasen erster und zweiter Mitosen separat analysiert. Als Maß für die Strahlenempfindlichkeit wurden in Metaphasen beider Mitosen dizentrische Chromosomen, sowie azentrische und zentrische Ringe ausgewertet. Darüberhinaus wurden Metaphasen der zweiten Mitose noch hinsichtlich des Auftretens von PCCs untersucht (4.4.1).

Symmetrische Chromosomentranslokationen und als Folge offener Chromosomenbrüche auftretende, überzählige Fragmente, sowie Chromatidbrüche und achromatische Läsionen wurden bei dieser Auswertung nicht erfaßt.

Die Ergebnisse werden zunächst für jede Spezies gesondert, in der Reihenfolge Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen beschrieben, in Tabellen aufgeführt und in Form der am besten angepaßten mathematischen Funktionen graphisch dargestellt.

Am Ende dieses Abschnitts (5.2.5) werden die zusammengefaßten Resultate miteinander verglichen.

5.2.1 Mensch

Wie aus Versuchsplan B (3.3) hervorgeht, wurden menschliche Lymphozyten mit Röntgen-Dosen zwischen 25 und 400 rad bestrahlt und nach 48 und 72 Stunden Kulturdauer fixiert.

Alle Versuche wurden mit dem Blut eines Spenders (Ma) durchgeführt.

In Tabelle 5.2.1.1 sind die dosisabhängigen Raten aberranter Metaphasen menschlicher Lymphozyten verzeichnet. Als "aberrant" gelten dabei solche Zellen, in deren Metaphasen dizentrische Chromosomen, Ringchromosomen oder PCCs beobachtet wurden. Als "normal" werden sämtliche Zellen bezeichnet, die keine der vorstehend genannten Aberrationen enthielten.

Im Dosisbereich von 0 bis 400 rad wurden für Metaphasen der ersten Mitose Schädigungsraten zwischen 0 und 80,89 % festgestellt. Metaphasen zweiter Mitosen waren innerhalb des selben Dosisbereichs bis zu 30,2 % geschädigt. Während im Bereich bis 200 rad die Schädigungsraten für M2-Metaphasen im Durchschnitt mehr als 50% der M1-Raten betragen, ist bei höheren Dosen ein Absinken unter dieses Niveau zu verzeichnen. Wie der Tabelle 5.2.1.2 zu entnehmen ist, weisen mit 200 rad betrahlte Zellen in den M1- wie M2-Metaphasen nach unterschiedlicher Kulturdauer zwar gleiche Schädigungsraten auf, allerdings ist dabei zu bemerken, daß die M2-Metaphasen zu mehr als 50% der M1-Rate geschädigt sind.

Die zusammengefaßten Werte beider Tabellen sind in Abbildung 5.2.1.1 als integrierte Exponentialfunktionen dargestellt.

Tabelle 5.2.1.1

Die dosisabhängigen Raten aberranter menschlicher Lymphozyten (M1 und M2) nach Bestrahlung in der G0-Phase und 72 Stunden Kulturdauer

Dosis (rad)	Anzahl Zellen						% Zellen	
	insgesamt		normal		mit Aberr.		mit Aberr.	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
0	100	142	100	142	0	0	0	0
25	100	133	96	131	4	2	4	1,5
50	100	114	85	104	15	10	15	8,77
100	100	120	77	105	23	15	23	12,5
200	100	130	67	98	33	32	33	24,62
300	100	121	40	90	60	31	60	25,62
400	157	149	30	104	127	45	80,89	30,2

Tabelle 5.2.1.2

Die Raten aberranter menschlicher Lymphozyten (M1 und M2) nach Bestrahlung in der G0-Phase und 48 und 72 Stunden Kulturdauer (Kontrolle und 200 rad)

Kultur- dauer (h)	Dosis (rad)	Anzahl Zellen						% Zellen	
		insgesamt		normal		mit Aberr.		mit Aberr.	
		M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
48	0	200	33	200	33	0	0	0	0
72	0	100	142	100	142	0	0	0	0
	gesamt:	300	175	300	175	0	0	0	0
	+ PE							0	0
48	200	200	10	134	8	66	2	33	20
72	200	100	130	67	98	33	32	33	24,62
	gesamt:	300	140	201	106	99	34	33	24,29
	+ PE							3,32	4,16

PE = Poisson Fehler

Abbildung 5.2.1.1

Die dosisabhängigen Raten aberranter Metaphasen menschlicher Lymphozyten in der ersten (M1) und zweiten Mitose (M2) nach Bestrahlung in der G0-Phase, dargestellt durch die integrierte Exponentialfunktion:

$$Y = 1 - e^{-aD + bD^2}$$

Darin bedeuten:

Y	Rate aberranter Zellen (PERCENT DAMAGED CELLS),
D	Dosis (DOSE) und
a und b	Parameter der Funktion.

Darin wird deutlich, daß die Rate geschädigter M1-Metaphasen innerhalb des untersuchten Dosisbereichs fast linear zunimmt. Für M2-Metaphasen tritt bei etwa 300 rad eine Sättigung der Schädigungsrate ein. Insgesamt betrachtet, sind die Metaphasen zweiter Mitosen nur etwa halb so häufig geschädigt wie M1-Metaphasen, was einer Elimination der strahleninduzierten Aberrationen von circa 50 % nach der ersten Mitose entspricht. Tabelle 5.2.1.3 erfaßt die dosisabhängigen Raten strahleninduzierter Aberrationen. In den M1-Metaphasen der mit 400 rad bestrahlten Lymphozyten steigt die Rate dizentrischer Chromosomen auf 1,33 pro Zelle an, während sie in den M2-Metaphasen nurmehr einen Wert von 0,32 pro Zelle erreicht. Die Tatsache, daß bei dieser Dosis die Metaphasen der zweiten Mitose weniger als die erwarteten 50 % dizentrischer Chromosomen auftreten, kann mit dem, aufgrund übermäßiger Schädigung zunehmenden Absterben der Zellen (Cell Killing) begründet werden. Dieses wiederum führt dazu, daß nur solche Zellen in eine weitere Replikationsrunde eintreten, deren Gesamtschädigung unterhalb ihrer Letalitätsgrenze liegt. Zentrische, sowie azentrische

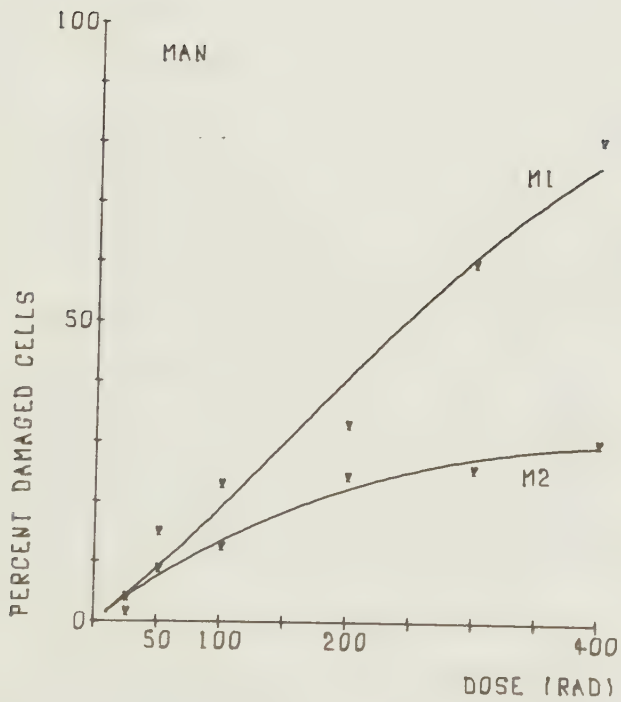


Abbildung 5.2.1.1

Ringchromosomen treten in der Metaphase erster und zweiter Mitosen mit etwa gleicher Häufigkeit auf. Als eine mögliche Ursache hierfür kann eine durch Reunion während der zweiten G1-Phase, erneut erfolgte Ringbildung der in der Anaphase der ersten Mitose "zerrissenen" Ringchromosomen angenommen werden. In den Metaphasen zweiter Mitosen wurden ausschließlich zentrische Ringchromosomen beobachtet; azentrische Ringe traten in M1-Metaphasen nur in etwa 4 % der Fälle auf.

Die Dosis-Effekt-Beziehung für dizentrische Chromosomen und Ringchromosomen, sowie für deren Summe sind als quadratische Funktionen in den Abbildungen 5.2.1.2 und 5.2.1.3 dargestellt. Für die Raten dizentrischer Chromosomen in M1-Metaphasen ist eine deutliche quadratische Abhängigkeit festzustellen.

Die Raten der dizentrischen Chromosomen in M2-Metaphasen sind durch einen Funktionsgraph mit eher linearen Merkmalen charakterisiert. Sie sinken nach einer Dosis von mehr als 200 rad zunehmend unter das 50 %-Niveau der M1-Kurve ab. Weil aber die Raten der Ringchromosomen in den Metaphasen beider Mitosen nur unwesentlich voneinander abweichen, ist für die Dosis-Effekt-

Abbildungen 5.2.1.2 und 5.2.1.3

Die dosisabhängigen Aberrationsraten in Metaphasen der ersten und zweiten Mitose (M1 und M2) menschlicher Lymphozyten nach Bestrahlung in der G0-Phase, dargestellt durch die quadratische Funktion:

$$Y = aD + bD^2$$

Darin bedeuten:

Y	Raten der dizentrischen (DIC) und Ringchromosomen (RINGS) (Abb. 5.2.1.2), Aberrationsraten insgesamt (ABERRATIONS/100 CELLS) (Abb. 5.2.1.3),
D	Dosis (DOSE) und
a und b	Parameter der Funktion.

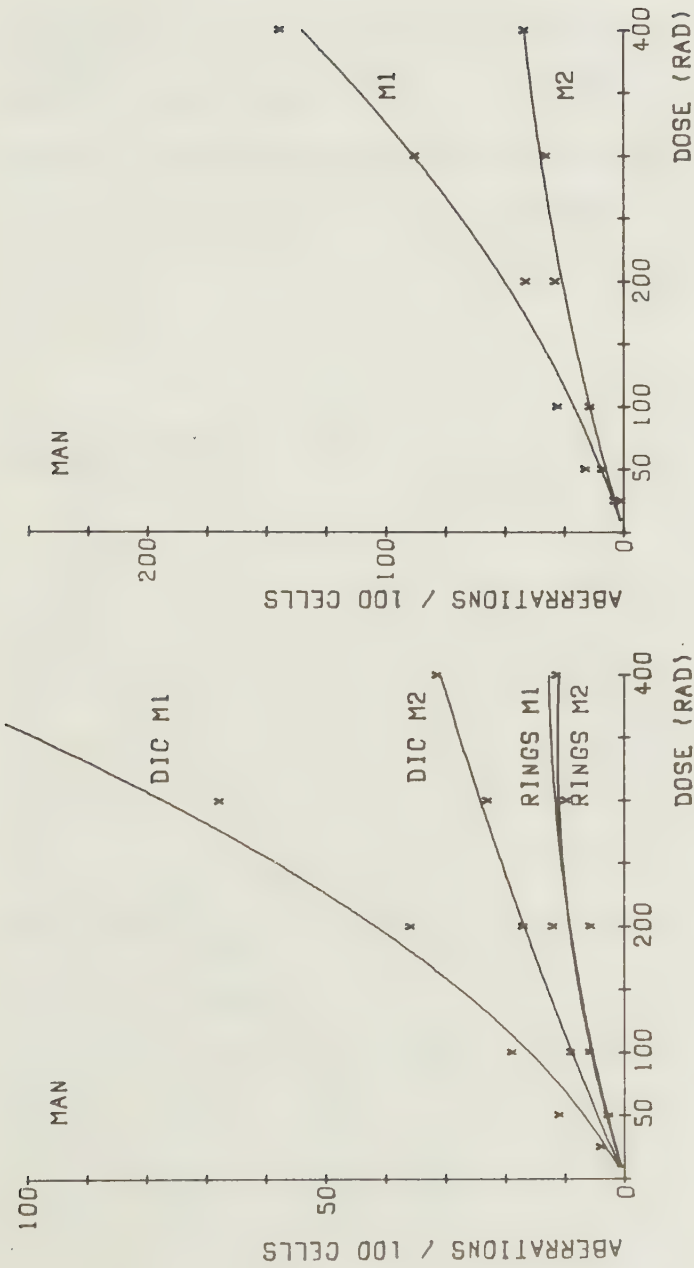


Abbildung 5.2.1.2

Abbildung 5.2.1.3

Beziehung der Summe der Aberrationen (dizentrische Chromosomen + Ringchromosomen) in Abbildung 5.2.1.3, im Dosisbereich von 0 bis 200 rad ein überproportionaler Anstieg zu beobachten. Das Abflachen der Kurve bei höheren Dosen (300 und 400 rad) kann dadurch verursacht worden sein, daß die stärker geschädigten Zellen vermehrt abgestorben sind und somit ihre zweite Mitose nicht mehr erreicht haben.

Tabelle 5.2.1.3

Die dosisabhängigen Aberrationsraten in Metaphasen der ersten und zweiten Mitose (M1 und M2) menschlicher Lymphozyten nach Bestrahlung in der G0-Phase

Dosis (rad)	Anzahl Zellen		Anzahl				Aberr. pro Zelle			
			diz.Chr.		Ringchr.		diz.Chr.		Ringchr.	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
0	100	142	0	0	0	0	0	0	0	0
25	100	133	4	2	0	0	0,04	0,02	0	0
50	100	114	11	7	5	3	0,11	0,06	0,05	0,03
100	100	120	19	10	9	7	0,19	0,08	0,09	0,06
200	100	130	43	22	7	17	0,43	0,17	0,07	0,13
300	100	121	68	28	20	12	0,68	0,09	0,2	0,2
400	157	149	209	47	18	16	1,33	0,32	0,11	0,11

Tabelle 5.2.1.4

Die PCC-Raten in den Metaphasen zweiter Mitosen nach Bestrahlung menschlicher Lymphozyten in der G0-Phase

Dosis (rad)	Anzahl Zellen		% Zellen mit PCC
	insgesamt	mit PCC	
0	142	0	0
25	133	1	0,75
50	114	1	0,88
100	120	8	6,67
200	130	10	7,69
300	121	17	14,05
400	149	24	16,11

Die in Metaphasen der zweiten Mitose menschlicher Lymphozyten beobachteten PCCs sind in Tabelle 5.2.1.4 angegeben. Darin ist bei 400 rad eine Zunahme PCC-haltiger Zellen auf 16,11 % zu verzeichnen; eine eindeutige Dosis-Effekt-Beziehung läßt sich daraus jedoch nicht ableiten. In den meisten Fällen wurden PCCs stets zusammen mit dizentrischen Chromosomen oder Ringchromosomen beobachtet.

5.2.2 Schimpanse

Versuchsplan B (3.3) zufolge standen Präparate aus drei Versuchsserien mit Fixierungszeiten von 40, 48 und 60 Stunden zur Auswertung. Das Blut für die erste Versuchsserie (40 h) stammte vom Spender "Cc", die zweite Versuchsserie (48 h) wurde mit dem Blut der Spender "Ca" und "Cb" durchgeführt, und für die dritte Versuchsserie wurde nur das Blut des Spenders "Cb" verwendet. Die Lymphozyten wurden mit Dosen zwischen 25 und 400 rad bestrahlt. Der Auswertung der Präparate lagen die gleichen Kriterien wie bei den entsprechenden Experimenten mit menschlichen Lymphozyten (5.2.1) zugrunde.

In Tabelle 5.2.2.1 sind die dosisabhängigen Raten geschädigter Zellen für die Spender "Ca" und "Cb" nach 48 Stunden Kulturdauer zusammengefaßt wiedergegeben. Eine getrennte Angabe der Einzelergebnisse ist nicht sinnvoll, da aufgrund teilweise schlechter Präparate, für jeden Spender und jede Dosis nicht

immer eine ausreichende Zahl an Metaphasen ausgewertet werden konnte. Im Dosisbereich von 0 bis 400 rad waren in Metaphasen erster Mitosen Schädigungsraten bis zu 97,14 % festzustellen. Die Metaphasen der zweiten Mitose waren bei Dosen von 300 und 400 rad zu einem Anteil von über 70 % geschädigt. Im Dosisbereich bis 100 rad traten für M2-Metaphasen etwa die halben Schädigungsraten der M1-Metaphasen auf. Bei höheren Dosen (200, 300 und 400 rad) war eine überproportionale Zunahme an geschädigten M2-Metaphasen zu verzeichnen.

Tabelle 5.2.2.1

Die dosisabhängigen Raten aberranter Schimpansenlymphozyten (M1 und M2) nach Bestrahlung in der G0-Phase und 48 Stunden Kulturdauer (Spender Ca + Cb)

Dosis (rad)	Anzahl Zellen						% Zellen mit Aberr.	
	insgesamt		normal		mit Aberr.		M1	M2
	M1	M2	M1	M2	M1	M2		
0	214	200	214	200	0	0	0	0
25	223	238	210	230	13	8	5,83	3,36
50	200	211	177	197	23	14	11,5	6,64
100	201	208	133	174	68	34	33,83	16,35
200	197	309	85	191	114	118	57,87	38,19
300	167	181	29	53	138	128	82,63	70,72
400	170	133	5	39	170	94	97,14	70,68

Tabelle 5.2.2.2

Die dosisabhängigen Raten aberranter Schimpansenlymphozyten (M1 und M2) nach Bestrahlung in der G0-Phase und 60 Stunden Kulturdauer (Spender Cb)

Dosis (rad)	Anzahl Zellen						% Zellen mit Aberr.	
	insgesamt		normal		mit Aberr.		M1	M2
	M1	M2	M1	M2	M1	M2		
0	100	100	100	100	0	0	0	0
50	100	100	88	95	12	5	12	5
100	100	100	71	83	29	17	29	17
200	100	100	59	76	41	24	41	24

Tabelle 5.2.2.3

Die Raten aberranter Schimpansenlymphozyten (M1 und M2) nach Bestrahlung (Kontrolle und 200 rad) in der G0-Phase und 40, 48 und 60 Stunden Kulturdauer

Kultur- dauer (h)	Dosis (rad)	Anzahl Zellen						% Zellen mit Aberr.	
		insgesamt		normal		mit Aberr.		M2	M2
40*	0	47	2	42	2	0	0	0	0
48**	0	214	200	214	200	0	0	0	0
60***	0	100	100	100	100	0	0	0	0
gesamt:		361	302	361	302	0	0	0	0
+ PE :								0	0
40*	200	36		20		16		44,44	
48**	200	197	309	85	191	114	118	57,87	38,19
60***	200	100	100	59	76	41	24	41	24
gesamt:		333	409	164	267	171	142	51,35	34,72
+ PE :								3,93	2,91
* Spender Cc						PE = natürlicher Fehler			
** Spender Ca + Cb									
*** Spender Cb									

In Tabelle 5.2.2.2 sind die Raten geschädigter Metaphasen der ersten und zweiten Mitose nach Bestrahlung mit 50, 100 und 200 rad und 60 Stunden Kulturdauer wiedergegeben.

Wie Tabelle 5.2.2.3 zu entnehmen ist, weisen die mit 200 rad bestrahlten und nach 40 Stunden aufgearbeiteten Lymphozyten in den Metaphasen der ersten und zweiten Mitose jeweils ähnliche Schädigungsraten wie nach 48 und 60 Stunden Kulturdauer auf. Die zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Versuchsserien zu erkennenden Unterschiede liegen innerhalb der natürlichen Fehlergrenzen der Auswertung (Poisson Fehler).

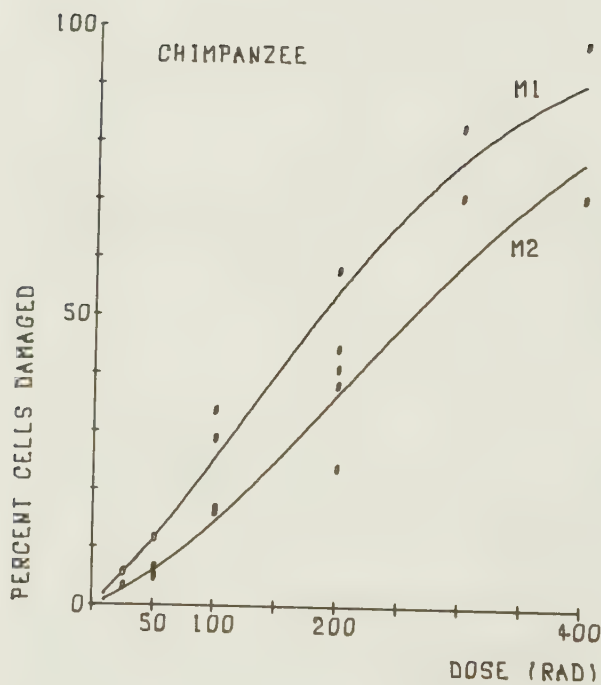


Abbildung 5.2.2.1

Die Werte aus den Tabellen 5.2.2.1, 5.2.2.2 und 5.2.2.3 wurden in Abbildung 5.2.2.1 dargestellt. Die Raten der geschädigten M1-Metaphasen steigen darin im Dosisbereich von 0 bis 300 rad fast linear an; danach nähert sich die Kurve bei abnehmender Steigung der 100 %-Sättigungsgrenze. Nach einem anfänglich quadratischen Kurvenanstieg ist für die Raten geschädigter M2-Metaphasen ab 100 rad eine lineare Dosis-Effekt-Beziehung zu beobachten. Auffallend daran ist, daß selbst im oberen Dosisbereich (200 bis 400 rad) ein weitaus größerer Teil an M2-Metaphasen, als die erwarteten 50 % der M1-Schädigungsrate zu erkennen ist. Als eine mögliche Ursache für diesen Effekt könnte eine, verglichen mit menschlichen Lymphozyten höhere Letalitätsgrenze für Schimpansenlymphozyten in Erwägung gezogen werden (vergleiche Abbildung 5.2.1.1).

Abbildung 5.2.2.1

Die dosisabhängigen Raten aberranter Metaphasen von Schimpansenlymphozyten in der ersten (M1) und zweiten Mitose (M2) nach Bestrahlung in der G0-Phase, dargestellt durch die integrierte Exponentialfunktion:

$$Y = 1 - e^{-aD + bD^2}$$

Darin bedeuten:	Y	die Rate aberranter Zellen (PERCENT DAMAGED CELLS),
	D	die Dosis (DOSE) und
a und b		die Parameter der Funktion.

Aus Tabelle 5.2.2.4 sind die dosisabhängigen Raten der dizentrischen Chromosomen und Ringchromosomen in den Metaphasen der ersten und zweiten Mitose zu entnehmen. Die Rate dizentrischer Chromosomen erreicht in den M1-Metaphasen der Lymphozyten des Schimpansen nach Bestrahlung mit 400 rad durchschnittlich 2,19 pro Zelle. In den Metaphasen zweiter Mitosen treten pro Zelle 0,92 dizentrische Chromosomen auf, was mit ziemlicher Genauigkeit den theoretisch erwarteten 50 % der M1-Rate entspricht. Für die übrigen Dosen läßt sich ein ähnliches Verhältnis ermitteln. Die in Metaphasen beider Mitosen errechneten Raten an Ringchromosomen können als nahezu gleich angesehen werden. Sie steigen innerhalb des Dosisbereichs von 0 bis 400 rad in M1-Metaphasen auf 0,27 und in M2-Metaphasen auf 0,21 pro Zelle an. An die in Tabelle 5.2.2.4 verzeichneten Werte für die Raten der beiden Aberrationsformen in Metaphasen erster und zweiter Mitosen wurden quadratische Funktionen angepaßt. Diese sind in Abbildung 5.2.2.2 dargestellt. Bei den Dosen 25, 50, 100 und 200 rad sind darauf für M2 jeweils die halben Raten der dizentrischen Chromosomen aus M1 zu erkennen. Die nach Dosen von 300

Abbildungen 5.2.2.2 und 5.2.2.3

Die dosisabhängigen Aberrationsraten in Metaphasen der ersten und zweiten Mitose (M1 und M2) nach Bestrahlung von Schimpansenlymphozyten in der G0-Phase, dargestellt durch die quadratische Funktion:

$$Y = aD + bD^2$$

Darin bedeuten:

Y	Raten der dizentrischen (DIC) und Ringchromosomen (RINGS) (Abb. 5.2.2.2), Aberrationsraten insgesamt (ABERRATIONS/100 CELLS) (Abb. 5.2.2.3);
D	Dosis (DOSE) und
a und b	Parameter der Funktion.

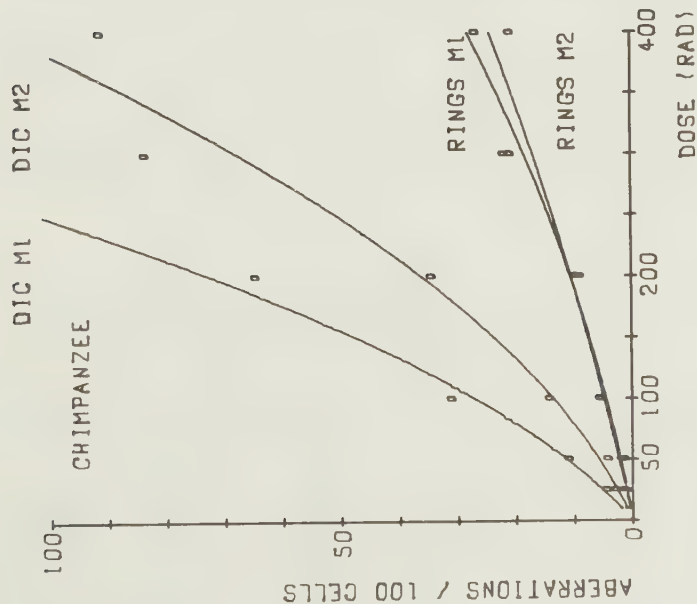


Abbildung 5.2.2.2

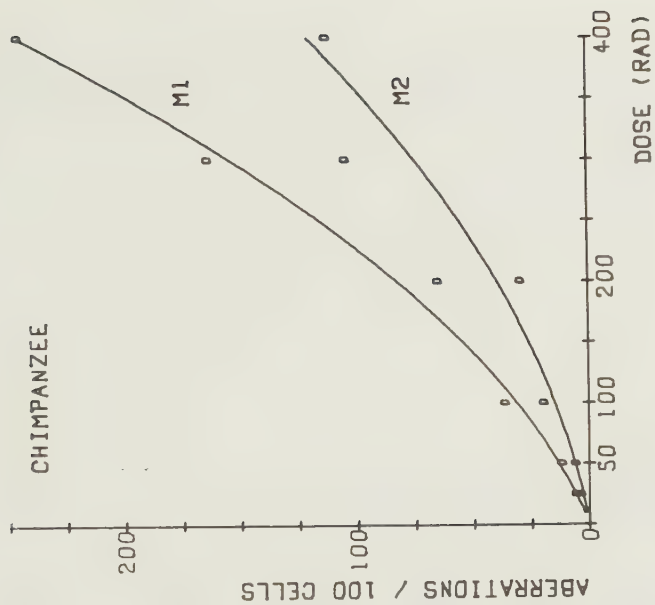


Abbildung 5.2.2.3

und 400 rad im Metaphasen erster Mitosen auftretenden Raten dizentrischer Chromosomen sind in der Darstellung nicht mehr enthalten; sie wurden jedoch zur Berechnung und Anpassung der Funktion eingesetzt. Die Kurven für die Raten der Ringchromosomen, die in Metaphasen der ersten und zweiten Mitose ermittelt wurden, verlaufen bis etwa 200 rad kongruent; danach (bis 400 rad) ist eine leichte Divergenz zu beobachten.

Tabelle 5.2.2.4

Die dosisabhängigen Aberrationsraten in Metaphasen der ersten und zweiten Mitose (M1 und M2) der Lymphozyten des Schimpansen nach Bestrahlung in der G0-Phase

Dosis (rad)	Anzahl		Anzahl				Aberr. pro Zelle			
	Zellen		diz.Chr.		Ringchr.		diz.Chr.		Ringchr.	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
0	214	200	0	0	0	0	0	0	0	0
25	233	238	10	7	3	2	0,04	0,03	0,01	0,01
50	300	311	33	13	4	6	0,11	0,04	0,01	0,02
100	301	308	94	44	16	17	0,31	0,14	0,05	0,06
200	333	409	216	143	30	40	0,65	0,35	0,09	0,1
300	167	181	292	152	37	38	1,67	0,84	0,22	0,21
400	175	133	383	122	47	28	2,19	0,92	0,27	0,21

Tabelle 5.2.2.5

Die PCC-Raten in den Metaphasen zweiter Mitosen nach Bestrahlung von Schimpansenlymphozyten in der G0-Phase

Dosis (rad)	Anzahl Zellen		% Zellen mit PCC
	insgesamt	mit PCC	
0	200	0	0
25	238	1	0,42
50	311	8	2,57
100	308	22	7,14
200	409	50	12,22
300	181	33	18,23
400	133	28	21,05

Die Kurven in Abbildung 5.2.2.3 stellen die aus den Raten der beiden Aberrationsformen zusammengefaßten Werte dar. Wenn man die Kurven miteinander vergleicht, dann ist zu erkennen, daß in den Lymphozyten des Schimpansen die Raten dosisabhängiger Aberrationen in den Metaphasen der zweiten Mitose etwa halb so groß ist wie in den M1-Metaphasen.

Die Raten PCC-haltiger Metaphasen der zweiten Mitose, die nach Bestrahlung in der G0-Phase in den Lymphozyten des Schimpansen beobachtet wurden sind in Tabelle 5.2.2.5 angegeben. Innerhalb des untersuchten Dosisbereichs nimmt der Anteil der Zellen mit PCC von 0.42 % bei 25 rad auf 21,05 % bei 400 rad mit stetig geringer werdender Steigung zu. In den meisten Fällen wurden in den Zellen mit PCC stets auch dizentrische Chromosomen oder Ringchromosomen beobachtet.

5.2.3 Schwein

Entsprechend dem Versuchsplan B (3.3) sind mit dem Blut von fünf Spendern (Pd, Pe, Pf, Pg und Ph) drei Versuchsserien mit Kultivierungszeiten von 30, 36 und 44 Stunden durchgeführt worden. Das erste Bestrahlungsexperiment (30 h) wurde mit dem Blut des Spenders "Pd" durchgeführt; für die zweite und dritte Versuchsserie (36 h und 44 h) wurden die Blute der Spender "Pe" und "Pf", beziehungsweise "Pg" und "Ph" verwendet.

Die Bestrahlung der Lymphozyten mit Röntgen-Dosen zwischen 25

und 400 rad wurde unter den in 2.5 erklärten Bedingungen, vor Beginn der Kultivierung (G0-Phase) durchgeführt. Der Auswertung lagen die gleichen Kriterien wie in den Experimenten mit menschlichen Lymphozyten (5.2.1) zugrunde. Aufgrund ungünstiger Kultivierungseigenschaften der Schweinelymphozyten (4.1), war in den einzelnen Präparaten jedoch nur eine geringe Zahl vollständige Metaphasen auswertbar. Der Versuch, wenigstens 100 Zellen für jede Mitose, sowie von jeden Spender und für jede Dosis auszuwerten, war nicht immer erfolgreich.

Tabelle 5.2.3.1

Die dosisabhängigen Raten aberranter Schweinelymphozyten (M1 und M2), 36 Stunden nach Bestrahlung (Spender Pe und Pf)

Dosis (rad)	Anzahl Zellen						% Zellen mit Aberr.	
	insgesamt		normal		mit Aberr.		M1	M2
	M1	M2	M1	M2	M1	M2		
0	100	43	99	43	1	0	1	0
50	200	83	175	75	25	8	12,5	9,64
100	200	56	160	51	40	5	20	8,93
200	233	44	162	38	72	6	30,9	13,64

Tabelle 5.2.3.2

Die dosisabhängigen Raten aberranter Schweinelymphozyten (M1 und M2), 44 Stunden nach Bestrahlung (Spender Pg und Ph)

Dosis (rad)	Anzahl Zellen						% Zellen mit Aberr.	
	insgesamt		normal		mit Aberr.		M1	M2
	M1	M2	M1	M2	M1	M2		
0	156	207	155	207	1	0	0,64	0
25	100	135	94	130	6	5	6	3,7
50	100	111	84	99	16	12	16	10,81
100	208	214	167	187	41	27	19,71	12,62
200	142	152	91	124	51	28	35,92	18,42
300	101	65	50	46	51	19	50,5	29,23
400	226	102	64	58	162	44	77,68	43,14

Tabelle 5.2.3.1 faßt die nach 36 Stunden Kulturdauer auftretenden Raten der dosisabhängig geschädigten Lymphozyten der Spender "Pe" und "Pf" zusammen. Im Dosisbereich zwischen 0 und 200 rad treten in Metaphasen erster Mitosen 1 bis 30,9 % geschädigter Zellen auf. Metaphasen zweiter Mitosen waren nach 200 rad zu 13,64 % geschädigt. Abgesehen vom Dosiseffekt nach 50 rad, dessen Wert relativ hoch ist, sind in den M2-Metaphasen für 100 und 200 rad weniger als 50 % der M1-Schädigungsraten festzustellen.

In Tabelle 5.2.3.2 sind die Schädigungsraten für die Spender "Pg" und "Ph" zusammengefaßt, die nach Bestrahlung mit 25 bis 400 rad und einer Kulturdauer von 44 Stunden in den Metaphasen erster und zweiter Mitosen aufgetreten sind. Wie in der nach 36 Stunden aufgearbeiteten Versuchsserie, war auch hier bereits in einer Metaphase der ersten Mitose der Kontrolle (0 rad) ein dizentrisches Chromosom zu beobachten gewesen. Zwischen 25 und 400 rad steigt die Rate aberranter M1-Metaphasen von 6 % auf 71,68 % an; M2-Metaphasen nehmen im gleichen Dosisbereich von 3,7 % auf 43,14 % zu, was durchschnittlich mehr als 60 % der M1-Raten entspricht.

Wie sich aus Tabelle 5.2.3.3 entnehmen läßt, weisen die mit 200 rad bestrahlten und nach 30, 36 und 44 Stunden aufgearbeiteten Lymphozyten in Metaphasen der ersten und zweiten Mitose, mit zunehmender Kulturdauer höhere Schädigungsraten auf. Die Ergebnisse weichen allerdings nur innerhalb ihrer natürlichen Fehlergrenzen (Poisson Fehler) voneinander ab.

Die dosisabhängigen Raten aberranter Metaphasen bei Schweine-
limphozyten in der ersten (M1) und zweiten Mitose (M2 nach Be-
strahlung in der G0-Phase, dargestellt durch die integrierte
Exponentialfunktion:

$$Y = 1 - e^{-aD + bD^2}$$

Darin bedeuten:

Y	die Rate aberranter Zellen (PERCENT DAMAGED CELLS),
D	Dosis (DOSE) und
a und b	Parameter der Funktion.

Die dosisabhängigen Raten aberranter Schweinelymphozyten (M1 und M2), 30, 36 und 44 Stunden nach Bestrahlung

Kultur- dauer (h)	Dosis (rad)	Anzahl Zellen							
		insgesamt				% Zellen			
		M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
30*	0	134	31	134	31	0	0	0	0
36**	0	100	43	99	43	1	0	1	0
44***	0	156	207	155	207	1	0	0,64	0
gesamt:		390	281	388	281	2	0	0,51	0
+ PE :								0,36	0
30*	200	27	3	20	0	7	0	25,93	0
36**	200	233	44	162	38	72	6	30,9	13,64
44***	200	142	152	91	124	51	28	35,92	18,42
gesamt:		402	199	173	162	130	34	32,34	17,09
+ PE :								2,84	2,93
*Spender Pd								PE = Poisson Fehler	
**Spender Pe + Pf									
***Spender Pq + Ph									

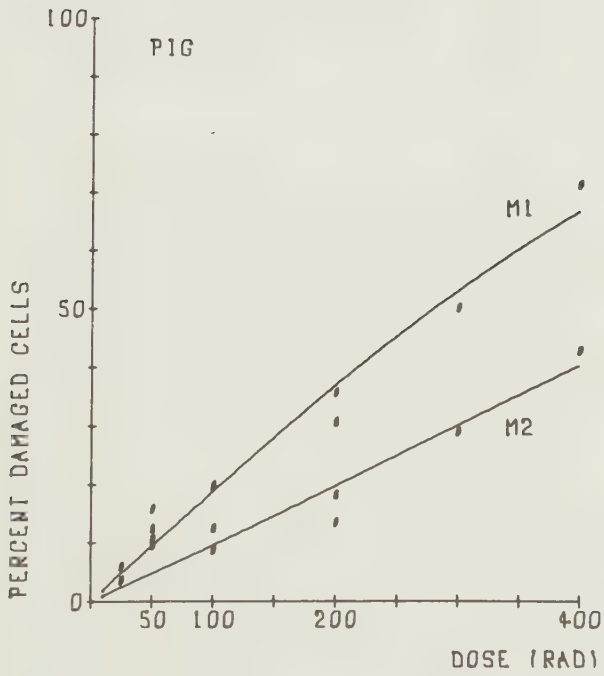


Abbildung 5.2.3.1

Die zusammengefaßten Werte aus den Tabellen 5.2.3.1, 5.2.3.2 und 5.2.3.3 sind in Abbildung 5.2.3.1 als integrierte Exponentialfunktionen dargestellt. Die Raten geschädigter M1- und M2-Metaphasen steigen im gesamten Dosisbereich (0 bis 400 rad) in linearer Weise an. Die Steigung für die M2-Kurve ist dabei etwa halb so groß wie für der M1-Kurve, woraus geschlossen werden kann, daß die in M2-Metaphasen ausgewerteten, strahleninduzierten Aberrationen nach der ersten Zellteilung etwa zu 50 % eliminiert waren.

Tabelle 5.2.3.4 enthält die Raten der in den Metaphasen erster und zweiter Mitose von Schweinelymphozyten nach Bestrahlung mit Dosen bis zu 400 rad aufgetretenen chromosomalen Aberrationen. Die Rate dizentrischer Chromosomen erreicht in M1-Metaphasen nach Bestrahlung mit 400 rad einen Wert von insgesamt 1,07 pro Zelle. In den Metaphasen zweiter Mitosen konnten pro Zelle 0,47 dizentrische Chromosomen ermittelt werden, was weniger als den erwarteten 50 % der M1-Rate entspricht. Für die Dosen 200 und 300 rad trifft dieses Verhältnis ebenfalls zu. Unterhalb 200 rad liegen die M2-Raten deutlich über dem theoretischen Niveau von 50 % der M1-Raten. In den 390 ausgewerteten Metaphasen unbestrahlter Lymphozyten (0 rad) wurden zwei dizentrische Chromosomen (= 0,005 pro Zelle) beobachtet.

Die Raten der Ringchromosomen steigen zwischen 25 und 400 rad in M1-Metaphasen von 0,02 auf 0,16 und in M2-Metaphasen von 0 auf 0,07 pro Zelle (M2-Rate bei 300 rad = 0,12) and, wobei die M2-Rate durchschnittlich zwei Drittel der M1-Rate beträgt.

Tabelle 5.2.3.4

Die dosisabhängigen Aberrationsraten in Metaphasen der ersten und zweiten Mitose (M1 und M2) von Schweinelymphozyten nach Bestrahlung in der G0-Phase

Dosis (rad)	Anzahl		Anzahl				Aberr. pro Zelle			
	Zellen		diz.Chr.		Ringchr.		diz.Chr.		Ringchr.	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
0	390	281	2	0	0	0	0,005	0	0	0
25	100	135	6	5	2	0	0,06	0,04	0,02	0
50	300	194	36	17	8	2	0,12	0,09	0,03	0,02
100	408	270	74	33	15	5	0,18	0,12	0,04	0,02
200	402	199	128	27	25	10	0,32	0,14	0,06	0,05
300	101	65	55	12	11	8	0,54	0,18	0,11	0,12
400	226	102	242	48	36	7	1,07	0,47	0,16	0,07

Die Kurven in den Abbildungen 5.2.3.2 und 5.2.3.3 stellen die Raten beider Aberrationsformen in den Metaphasen der ersten und der zweiten Mitose dar. Dabei sind an die entsprechenden Werte aus Tabelle 5.2.3.4 quadratische Funktionen angepaßt worden.

In Abbildung 5.2.3.2 ist zu erkennen, daß die M1-Raten dizen-trischer Chromosomen innerhalb des untersuchten Dosisbereichs zunehmend ansteigen, während für die M2-Raten ein leichtes Abnehmen der Steigung zu beobachten ist, sodaß die Kurve bei 400 rad deutlich unter das 50 %-Niveau der M1-Kurve absinkt. Die Kurven (M1 und M2) für die Raten der Ringchromosomen verlaufen nahezu linear. Die Steigung der M2-Kurve beträgt etwa zwei Drittel der M1-Kurve und entspricht somit dem durchschnittlichen Verhältnis beider Raten.

Die Kurven in Abbildung 5.2.3.3 stellen die zusammengefaßten Raten beider Aberrationsformen dar. Sie zeigen, daß in Metaphasen der zweiten Mitose etwa halb so viele dosisabhängige Aberrationen wie in den M1-Metaphasen auftreten.

Abbildungen 5.2.3.2 und 5.2.3.3

Die dosisabhängigen Aberrationsraten in Metaphasen der ersten und zweiten Mitose (M1 und M2) Schweinelymphozyten nach Bestrahlung in der G0-Phase, dargestellt durch die quadratische Funktion:

$$Y = aD + bD^2$$

Darin bedeuten: Y Raten der dizentrischen (DIC) und Ringchromosomen (RINGS) (Abb. 5.2.3.2), Aberrationsraten insgesamt (ABERRATIONS/100 CELLS) (Abb. 5.2.3.3); D Dosis (DOSE) und a und b Parameter der Funktion.

In den M2-Metaphasen von Schweinelymphozyten waren nur vereinzelt PCCs zu beobachten gewesen, was zum Teil auf die relativ schlechten Präparationserfolge zurückzuführen sein kann. Eine Beziehung ihrer Häufigkeit zur Dosis läßt sich daher, wie aus Tabelle 5.2.3.5 hervorgeht, nicht feststellen.

Tabelle 5.2.3.5

Die PCC-Raten in den Metaphasen zweiter Mitosen nach Bestrahlung von Schweinelymphozyten in der G0-Phase

Dosis (rad)	Anzahl Zellen		% Zellen mit PCC
	insgesamt	mit PCC	
0	281	0	0
25	135	2	1,48
50	194	0	0
100	270	1	0,37
200	199	0	0
300	65	4	6,15
400	133	5	3,76

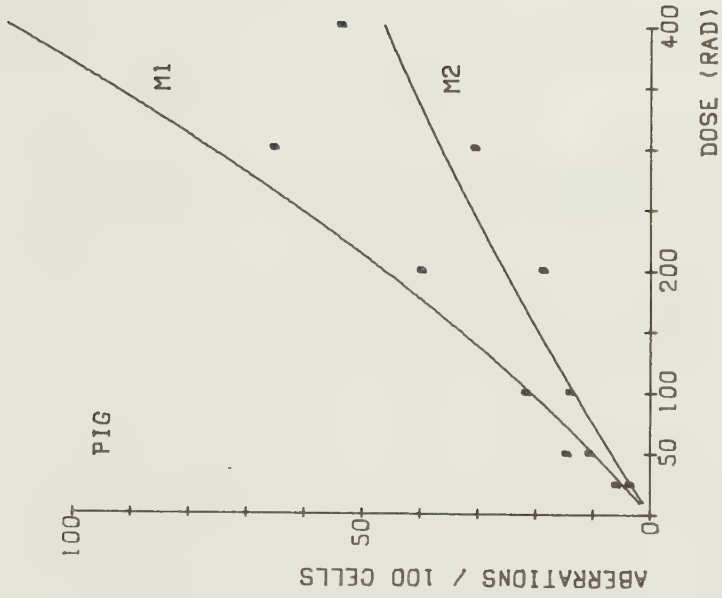


Abbildung 5.2.3.3

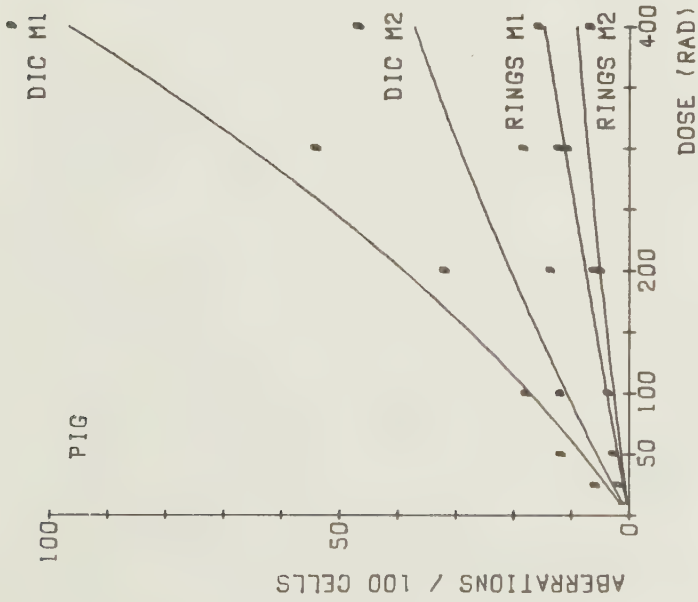


Abbildung 5.2.3.2

5.2.4 Kaninchen

Wie dem Versuchsplan B (3.3) zu entnehmen ist, sind für die Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit von Kaninchenlymphozyten zwei, den Dosisbereich von 0 bis 400 rad erfassende Bestrahlungsexperimente durchgeführt worden. Für die nach 42 Stunden aufgearbeitete Versuchsserie wurde das Blut der Spender "Ra", "Rb" und "Rc" verwendet; die 48 Stunden nach Ansatz fixierten Lymphozyten stammten von den Spendern "Rc" und "Rd". Darüberhinaus standen noch unausgewertete Präparate eines Experiments zur Verfügung, das nicht im Rahmen vorliegender Arbeit, jedoch unter den selben Kultur- und Bestrahlungsbedingungen wie alle übrigen Versuche dieser Art durchgeführt worden war. Die Aufarbeitung der Kulturen dieses Experiments erfolgte bereits 32 Stunden nach der Bestrahlung mit 200 rad in der G₀-Phase. Aufgrund der ziemlich niedrigen Mitoserate in den Kulturen von Kaninchenlymphozyten war nicht immer eine ausreichende Zahl an Metaphasen für jeden Spender und für jede Dosis auswertbar. Eine getrennte Angabe der Einzelergebnisse für jeden Spender erschien daher nicht sinnvoll, und so wurden die jeweiligen Auswertungsergebnisse von einer Versuchsserie zusammengefaßt. Die dosisabhängigen Raten aberranter Zellen für die Spender "Ra", "Rb" und "Rc" nach 42 Stunden Kulturdauer sind aus Tabelle 5.2.4.1 zu ersehen. Im Dosisbereich von 0 bis 400 rad waren in Zellen der ersten Mitose bis zu 64,91 % geschädigte Metaphasen zu beobachten. Die Metaphasen in der zweiten Mitose waren bei 400 rad zu einem Anteil von 39,28 % geschädigt.

Tabelle 5.2.4.1

Die dosisabhängigen Raten aberranter Kaninchenlymphozyten (M1 und M2), 42 Stunden nach Bestrahlung in der G0-Phase (Spender Ra, Rb und Rc)

Dosis (rad)	Anzahl Zellen						% Zellen mit Aberr.	
	insgesamt		normal		mit Aberr.		M1	M2
	M1	M2	M1	M2	M1	M2		
0	200	200	200	200	0	0	0	0
25*								
50	200	100	198	100	2	0	1	0
100	228	100	109	197	19	7	8,33	7
200	207	111	153	94	54	19	26,09	15,32
300*								
400**	57	28	20	17	37	11	64,91	39,28

* ausgefallen

** nur Spender Rb

Tabelle 5.2.4.2

Die dosisabhängigen Raten aberranter Kaninchenlymphozyten (M1 und M2), 48 Stunden nach Bestrahlung in der G0-Phase (Spender Rc und Rd)

Dosis (rad)	Anzahl Zellen						% Zellen mit Aberr.	
	insgesamt		normal		mit Aberr.		M1	M2
	M1	M2	M1	M2	M1	M2		
0	100	200	100	200	0	0	0	0
25	137	102	135	100	2	2	1,46	1,96
50*								
100	60	58	54	56	6	2	10	3,45
200	42	38	33	36	11	4	26,19	10,53
300**	18	16	8	10	10	6	55,56	37,5
400**	17	5	4	2	13	3	76,47	60

* ausgefallen

** nur Spender Rc

Bei einer Dosis von 50 rad traten in der zweiten Mitose keine und in der ersten Mitose nur geringfügig geschädigte Metaphasen auf.

In Tabelle 5.2.4.2 sind die Raten geschädigter Metaphasen der ersten und zweiten Mitose 48 Stunden nach Bestrahlung wiedergegeben. Bei 400 rad wurden für M1-Metaphasen Schädigungsraten von 76,47 % festgestellt, und für M2-Metaphasen lag die Rate bei 60 %. Diese Werte sind jedoch aufgrund der sehr geringen Anzahl auswertbarer Metaphasen ($M1 = 17$ und $M2 = 5$) mit einem so großen natürlichen Fehler ($PE_{M1} = 21,2$ und $PE_{M2} = 34,6$) behaftet, daß die Abweichungen zu den Ergebnissen in Tabelle 5.2.4.1 als nicht signifikant betrachtet werden können. Die übrigen Befunde zeigen, daß, unabhängig von der Kulturdauer, ungefähr gleiche Dosiseffekte auftreten und daß Metaphasen der zweiten Mitose etwa halb so häufig geschädigt sind wie M1-Metaphasen, was ebenfalls aus Tabelle 5.2.4.3 hervorgeht.

Abbildung 5.2.4.1

Die dosisabhängigen Raten aberranter Kaninchenlymphozyten (M1 und M2) nach Bestrahlung in der G0-Phase, dargestellt durch die integrierte Exponentialfunktion:

$$Y = 1 - e^{-aD + bD^2}$$

Darin bedeuten:	Y	die Rate aberranter Zellen (PERCENT DAMAGED CELLS),
	D	Dosis (DOSE) und
	a und b	Parameter der Funktion.

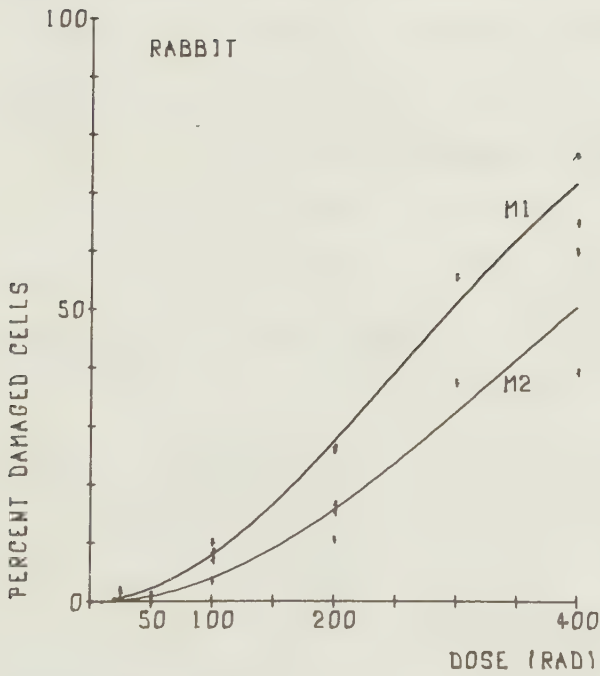


Abbildung 5.2.4.1

Die zusammengefaßten Werte aus den Tabellen 5.2.4.1, 5.2.4.2 und 5.2.4.3 sind in Abbildung 5.2.4.1 als integrierte Exponentialfunktionen dargestellt. Darin nehmen Die Raten geschädigter Metaphasen beider Mitosen bis etwa 200 rad mit mit dem Quadrat der Dosis zu. Im darüberliegenden Dosisbereich ist dann ein linearer Anstieg beider Kurven zu beobachten. Die Dosis-Effekt-Kurve für geschädigte Metaphasen der zweiten Mitose liegt dabei eindeutig über dem erwarteten 50 %-Niveau der M1-Kurve. Dieser Sachverhalt, könnte wie beim Schimpansen (siehe Abb. 5.2.2.1), auf eine, im Vergleich zu menschlichen Lymphozyten höhere Letalitätsgrenze zurückzuführen sein.

Tabelle 5.2.4.3

Die Raten aberranter Kaninchenlymphozyten (M1 und M2) nach Bestrahlung in der G0-Phase (Kontrolle und 200 rad) und 32, 42 und 48 Stunden Kulturdauer

Kultur- dauer (h)	Dosis (rad)	Anzahl Zellen						% Zellen mit Aberr.	
		insgesamt		normal		mit Aberr.		M1	M2
		M1	M2	M1	M2	M1	M2		
32***	0	100	55	100	55	0	0	0	0
42*	0	200	200	200	200	0	0	0	0
48**	0	100	200	100	200	0	0	0	0
gesamt:		400	455	400	455	0	0	0	0
+ PE :								0	0
32***	200	81	72	60	60	21	12	25,93	16,67
42*	200	207	111	153	94	54	17	26,09	15,32
48**	200	42	38	31	34	11	4	26,19	10,53
gesamt:		330	221	244	188	86	33	26,09	14,93
+ PE :								2,81	2,6

* Spender "Ra"+"Rb"+"Rc"

PE = natürlicher Fehler

** Spender "Rc"+"Rd"

*** die Versuche wurden nicht im Rahmen vorliegender Arbeit durchgeführt.

Aus Tabelle 5.2.4.4 sind die dosisabhängigen Raten der dizentrischen Chromosomen und Ringchromosomen in den Metaphasen der ersten und zweiten Mitose zu entnehmen. Die Rate dizentrischer Chromosomen erreicht in den M1-Metaphasen der Lymphozyten des Kaninchens nach Bestrahlung mit 400 rad durchschnittlich 0,91 pro Zelle. In den Metaphasen zweiter Mitosen treten pro Zelle 0,36 dizentrische Chromosomen auf, was zwar deutlich unter den theoretisch zu erwartenden 50 % der M1-Rate liegt, aber wegen zu geringer Zellzahlen nicht abgesichert werden kann. Für das Verhältnis bei 300 rad besteht diesbezüglich die gleiche Situation. Für die übrigen Dosen läßt sich aus den Raten der aberranten M1- und M2-Metaphasen ein Verhältnis von etwa 1:2 ermitteln. Die in den Metaphasen beider Mitosen aufgetretenen Ringchromosomen ergeben nahezu gleiche Raten. Diese steigen im Dosisbereich von 0 bis 400 rad in M1-Metaphasen auf 0,11 und in M2-Metaphasen auf 0,15 pro Zelle an.

An die in Tabelle 5.2.4.4 verzeichneten Werte für die Raten der beiden Aberrationsformen in den Metaphasen der ersten und zweiten Mitose wurden quadratische Funktionen angepaßt. Diese sind in den Abbildungen 5.2.4.2 und 5.2.4.3 dargestellt.

Darauf sind bei der M2-Kurve für den Dosisbereich bis 200 rad jeweils die halben Raten, der in M1-Metaphasen beobachteten dizentrischen Chromosomen festzustellen. Die Kurven für die Raten der Ringchromosomen, die in Metaphasen der ersten und zweiten Mitose ermittelt wurden, haben bis etwa 200 rad den gleichen Verlauf. Danach (bis 400 rad) ist eine leichte Divergenz der Kurven zu beobachten.

Tabelle 5.2.4.4

Die dosisabhängigen Aberrationsraten in Kaninchenlymphozyten der ersten (M1) und zweiten Mitosen (M2) nach Bestrahlung in der G0-Phase

Dosis (rad)	Anzahl Zellen		Anzahl				Aberr. pro Zelle			
			diz. Chr.		Ringchr.		diz. Chr.		Ringchr.	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
0	400	455	0	0	0	0	0	0	0	0
25	137	102	2	1	0	1	0,01	0,01	0	0,01
50	200	100	2	0	0	0	0,01	0	0	0
100	288	158	23	7	3	2	0,08	0,04	0,01	0,01
200	330	221	83	26	15	10	0,25	0,12	0,05	0,05
300	18	16	12	4	1	2	0,67	0,25	0,06	0,13
400	74	33	67	12	8	5	0,91	0,36	0,11	0,15

In Abbildung 5.2.4.3 sind die zusammengefaßten Werte der beiden Aberrationsformen dargestellt. Vergleicht man beide Kurven miteinander, dann ist zu erkennen, daß die Raten dosisabhängiger Aberrationen in Metaphasen der zweiten Mitose etwa halb so groß sind wie in den M1-Metaphasen.

Abbildungen 5.2.4.2 und 5.2.4.3

Die dosisabhängigen Aberrationsraten in Metaphasen der ersten (M1) und zweiten Mitose (M2) nach Bestrahlung von Kaninchenlymphozyten in der G0-Phase, dargestellt durch die quadratische Funktion:

$$Y = aD + bD^2$$

Darin bedeuten: Y Raten der dizentrischen (DIC) und Ringchromosomen (RINGS) (Abb. 5.2.4.2), Aberrationsraten insgesamt (ABERRATIONS/100 CELLS) (Abb. 5.2.4.3); D Dosis (DOSE) und a und b Parameter der Funktion.

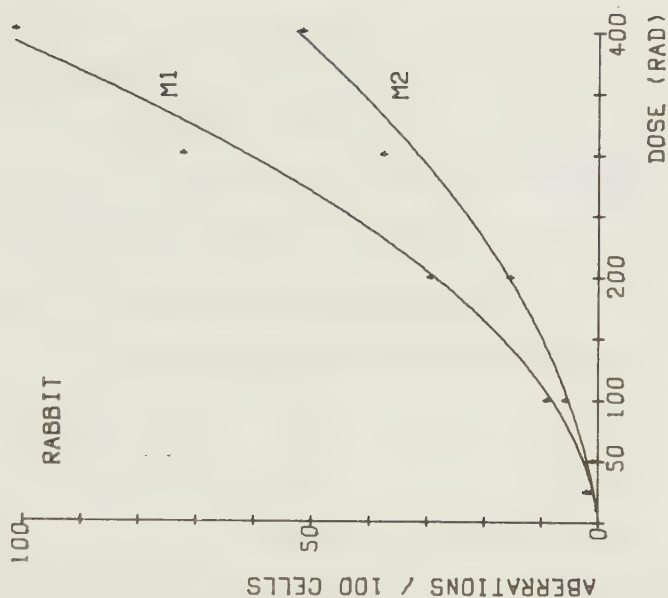


Abbildung 5.2.4.3

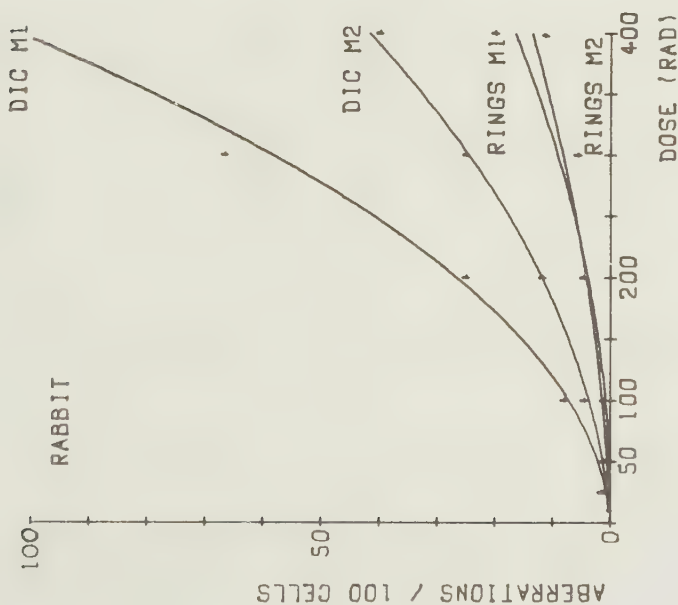


Abbildung 5.2.4.2

Die Raten PCC-haltiger Metaphasen der zweiten Mitose, die nach Bestrahlung in der G₀-Phase in den Lymphozyten des Kaninchens beobachtet wurden, sind in Tabelle 5.2.4.5 angegeben.

In Metaphasen der zweiten Mitosen waren PCCs erst nach einer Dosis von 100 rad zu beobachten gewesen. Von dieser Dosis an nimmt der Anteil PCC-haltiger Metaphasen von 3,16 % auf 21,21 % zu. In den meisten Fällen wurden in den Zellen mit PCC stets auch dizentrische Chromosomen oder Ringchromosomen beobachtet.

Tabelle 5.2.2.5

Die PCC-Raten in den Metaphasen zweiter Mitosen nach Bestrahlung von Kaninchen-lymphozyten in der G₀-Phase

Dosis (rad)	Anzahl Zellen		% Zellen mit PCC
	insgesamt	mit PCC	
0	455	0	0
25	102	0	0
50	100	0	0
100	158	5	3,16
200	221	15	6,79
300	16	3	18,75
400	33	7	21,21

5.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse (B)

Die Analyse der G0-Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten von Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen ergab für M1- und M2-Metaphasen innerhalb des untersuchten Dosisbereichs von 0 bis 400 rad eindeutige Dosis-Effekt-Beziehungen.

In Tabelle 5.2.5.1 werden die Raten aberranter Lymphozyten nach Bestrahlung mit 200 rad in der G0-Phase miteinander verglichen. Dabei zeigt sich für die Lymphozyten des Schimpansen eine höhere Rate geschädigter Metaphasen als bei den übrigen Spezies.

Beim Kaninchen betragen die Raten an aberranten Lymphozyten mit 26,06 % in M1- und 14,93 % in M2-Metaphasen nur etwa die Hälfte der mit 51,87 % in M1- und mit 34,72 % in M2-Metaphasen geschädigten Schimpansenlymphozyten. Die Schädigungsraten bei Mensch und Schwein sind mit 33 % und 32,72 % für die Metaphasen erster Mitosen nahezu gleich; Metaphasen zweiter Mitosen sind bei Lymphozyten des Menschen zu 24,29 % und bei Schweinelymphozyten zu 17,09 % geschädigt.

Tabelle 5.2.5.1

Die Raten der aberranten Lymphozyten von Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen (M1 und M2) nach Bestrahlung mit 200 rad in der G0-Phase

Spezies	Anzahl Zellen						% Zellen mit Aberr.	
	insgesamt		normal		mit Aberr.			
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
Mensch	300	140	201	106	99	34	33	24,29
Schimpanse	333	409	164	267	171	142	51,87	34,72
Schwein	402	199	273	162	130	34	32,34	17,09
Kaninchen	330	221	244	188	86	33	26,06	14,93

Die dosisabhängigen Raten der durch strukturelle Aberrationen geschädigten Zellen (PERCENT DAMAGED CELLS) sind in Abbildung 5.2.5.1 für alle vier Spezies gemeinsam dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die Zunahme der Rate aberranter M1-Metaphasen des Schimpansen deutlich größer ist als bei den übrigen Spezies. Im oberen Dosisbereich (400 rad) weichen die Raten an geschädigten M1-Metaphasen bei Mensch, Schwein und Kaninchen nur noch gering voneinander ab. Dieser Sachverhalt gilt ebenfalls für die Raten strahleninduzierter Aberrationen, und ist in Abbildung 5.2.5.2 dargestellt. Die Raten der dizentrischen Chromosomen werden in Abbildung 5.2.5.3 gesondert miteinander verglichen.

Im Unterschied zu den Raten geschädigter Lymphozyten, die sich aufgrund des Erreichens einer oberen Grenze von maximal 100 % an eine integrierte Exponentialfunktion (Abb. 5.2.5.1) anpassen, nehmen die Aberrationsraten innerhalb des untersuchten Dosisbereichs nach einer linear-quadratischen Funktion zu.

In Tabelle 5.2.5.2 sind die, bei einer Dosis von 200 rad in den Lymphozyten der vier Spezies beobachteten Raten chromosomaler Aberrationen (dizentrische- und Ringchromosomen) aufgeführt.

Abbildung 5.2.5.1

Die dosisabhängigen Raten aberranter Metaphasen erster Mitosen der Lymphozyten von Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen nach Bestrahlung in der G0-Phase, dargestellt als integrierte Exponentialfunktionen:

$$Y = 1 - e^{-aD + bD^2}$$

Darin bedeuten:

Y	Rate aberranter Zellen (PERCENT DAMAGED CELLS),
D	Dosis (DOSE) und
a und b	Parameter der Funktion.

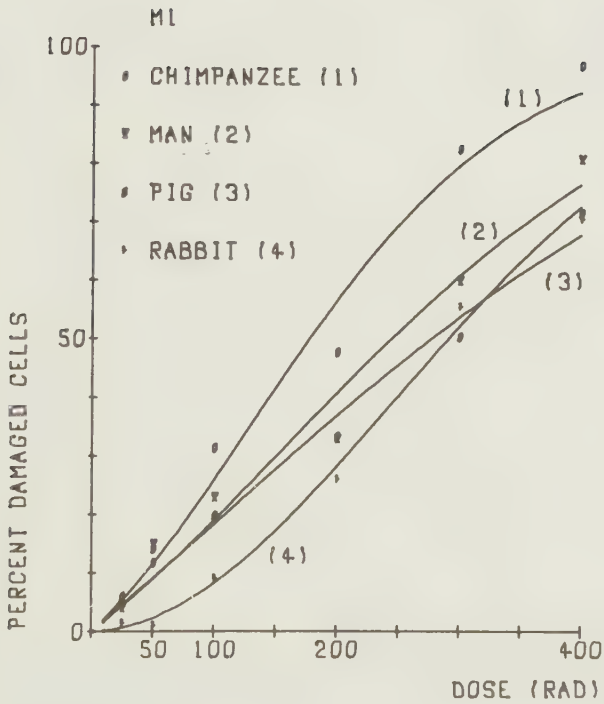


Abbildung 5.2.5.1

Tabelle 5.2.5.2

Die Raten chromosomaler Aberrationen in Metaphasen der ersten und der zweiten Mitose (M1 und M2) der Lymphozyten von Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen nach Bestrahlung mit 200 rad in der G0-Phase

Spezies	Anzahl Zellen		Aberrationen pro Zelle					
			diz.Chr.		+ Ringchr.		= insgesamt	
			M1	M2	M1	M2	M1	M2
Mensch	300	140	0,36	0,17	0,06	0,12	0,42	0,29
Schimpanse	333	409	0,65	0,35	0,09	0,1	0,74	0,45
Schwein	402	199	0,32	0,14	0,06	0,05	0,38	0,19
Kaninchen	330	221	0,25	0,12	0,05	0,05	0,3	0,17

M2-Metaphasen der Lymphozyten von Schwein und Kaninchen weisen etwa die halben Schädigungsraten der M1-Metaphasen auf, während die M2-Metaphasen der Lymphozyten von Mensch und Schimpanse deutlich zu mehr als 50 % der M1-Raten geschädigt sind.

Die Lymphozyten des Schimpansen zeigen, bezüglich ihrer Raten chromosomaler Aberrationen pro Zelle, mit 0,74 in M1-Metaphasen und 0,45 in M2-Metaphasen, im Vergleich zu den übrigen untersuchten Spezies die höchste Strahlenempfindlichkeit.

Abbildungen 5.2.5.2 und 5.2.5.3

Die dosisabhängigen Aberrationsraten in Metaphasen der ersten Mitose (M1) der Lymphozyten von Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen nach Bestrahlung in der G0-Phase, dargestellt als quadratische Funktionen:

$$Y = aD + bD^2$$

Darin bedeuten:

- Y Raten der Aberrationen insgesamt (ABERRATIONS / 100 CELLS) in
Abbildung 5.2.5.2, beziehungsweise
Raten der dizentrischen Chromosomen
(DICENTRIC CHROMOSOMES / 100 CELLS)
in Abbildung 5.2.5.3
- D Dosis (DOSE) und
- a und b Parameter der Funktion.

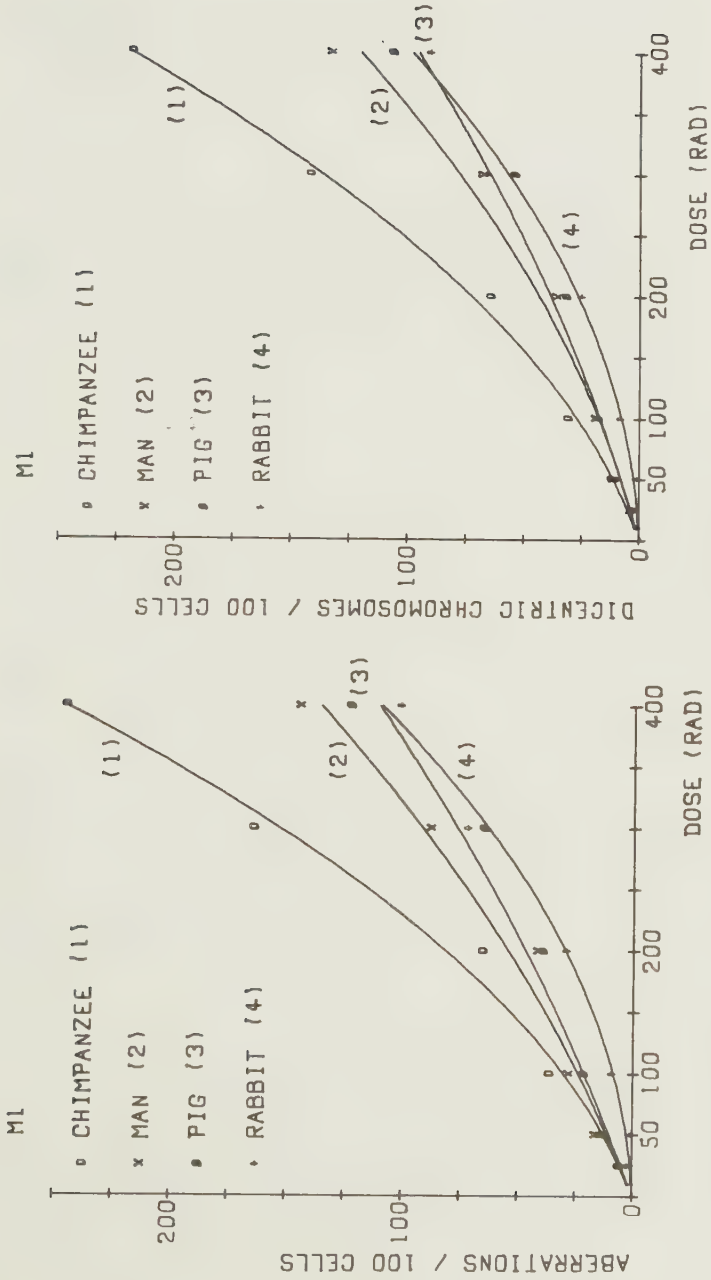


Abbildung 5.2.5.3

Abbildung 5.2.5.2

In Kaninchenlymphozyten wurde mit 0,3 und 0,17 Aberrationen pro Zelle, in Metaphasen der ersten beziehungsweise zweiten Mitose nach Bestrahlung mit 200 rad die geringste Strahlenempfindlichkeit festgestellt.

Über den gesamten untersuchten Dosisbereich hinweg betrachtet (Abbildungen 5.2.5.2 und 5.2.5.3), unterscheiden sich die für menschliche Lymphozyten und für Schweinelymphozyten ermittelten Werte nur unwesentlich von den für Kaninchenlymphozyten gefundenen Ergebnissen.

5.3 Die Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten während der G2-Phase und der Einfluß von Koffein (C)

Nach Bestrahlung der kultivierten Lymphozyten mit Dosen von 50, 100 und 200 rad (2.5), sowie anschließender Markierung der DNS mit tritiiertem Thymidin (2.4) und Koffeinbehandlung (2.6) traten in den nach Autoradiographie der Präparate nicht radioaktiv markierten Metaphasen ausschließlich Aberrationen chromatidaler Art (4.4.2) auf. Es wurden offene Chromatid- und Isochromatidbrüche (B' und B''), chromatidale und subchromatidale Translokationen (RB' und sub RB'), sowie achromatische Läsionen (AL) (4.4.3) beobachtet und ausgewertet.

Grundsätzlich wurden stets vollständige Metaphasen analysiert. Zellen mit mehr als 10 Brüchen oder mehr als 20 AL wurden ungeachtet der Vollständigkeit der Metaphase gewertet, sofern in diesen Zellen offensichtlich nicht weniger als etwa 90 % der vollständigen Chromosomenanzahl vorhanden waren.

Metaphasen, deren Chromosomen aufgrund der Inkorporation tritiierten Thymidins nach Autoradiographie der Präparate von Silberkörnern überlagert waren, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Im Folgenden werden die Auswertungsergebnisse für jede Spezies, in der Reihenfolge Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen gesondert abgehandelt und in Tabellenform, sowie graphisch dargestellt. Am Schluß dieses Abschnitts (5.3.5) werden die Resultate zusammengefaßt und miteinander verglichen.

5.3.1 Mensch

Die kultivierten Lymphozyten wurden entsprechend den Ergebnissen der Zellzyklusanalyse (5.1.1) nach 60 Stunden bestrahlt (3.4, Versuchsplan C), anschließend radioaktiv markiert und mit Koffein behandelt. Die Kulturen wurden dann nach 2, 4, 6 und 8 Stunden der weiteren Inkubation bei 37 Grad C aufgearbeitet (3.4, Versuchsplan C'). Alle Versuche wurden mit dem Blut des Spenders "Ma" durchgeführt.

Aus Tabelle 5.3.1.1 ist zu entnehmen, daß die Raten geschädigter Metaphasen mit steigender Dosis zunehmen und, bis auf eine Ausnahme (Fix. I, 200 rad + Koffein), in den mit Koffein (+) behandelten Zellen größer sind als in den unbehandelten (-). Ferner ist zu ersehen, daß die Raten geschädigter Zellen abnehmen, je später sie fixiert wurden. Davon ausgenommen sind die mit 200 rad bestrahlten Lymphozyten: in unbehandelten Kulturen steigen die Raten geschädigter Lymphozyten zwischen der 2. (Fix. I) und 4. Stunde (Fix. II) nach Bestrahlung von 96,7 % auf 98,3 % und in koffeinbehandelten von 77,2 % auf 88 %.

Für unbestrahlte Zellen ergaben sich Schädigungsraten zwischen 4 % und 7 %. Zwischen der 4. (Fix. II) und 6. Stunde (Fix. III) nach Bestrahlung ist die größte Abnahme der Raten geschädigter Zellen zu beobachten.

Dieser Sachverhalt ist in den Abbildungen 5.3.1.1a und 5.3.1.1b in Form von Dosis-Effekt-Beziehungen, sowie in den Abbildungen 5.3.1.2a und 5.3.1.2b als Zeit-Effekt-Beziehungen verdeutlicht.

Tabelle 5.3.1.1

Die dosisabhängigen Raten geschädigter menschlicher Lymphozyten nach Bestrahlung in der G2-Phase und gleichzeitiger Behandlung mit Koffein

Fix.*	Dosis (rad)	Anzahl Zellen				Anzahl Zellen % Zellen			
		insgesamt		normal		geschädigt***			
		***	-**	+	-	+		-	
I	0	200	140	189	131	11	5,5	9	6,4
	50	130	180	9	32	121	93,9	148	82,2
	100	98	116	6	10	92	93,9	106	91,4
	200	101	92	23	3	78	77,2	89	96,7
II	0	100	100	93	96	7	7	4	4
	50	100	100	25	41	75	75	59	59
	100	136	150	23	27	113	83,1	123	82
	200	125	59	15	1	110	88	58	98,3
III	0	100	100	94	96	6	6	4	4
	50	100	100	65	74	35	35	26	26
	100	100	100	49	65	51	51	35	35
	200	100	100	24	51	76	76	49	49
IV	0	100	100	96	96	4	4	4	4
	50	100	100	77	89	23	23	11	11
	100	100	100	70	79	30	30	21	21
	200	100	100	38	70	62	62	30	30

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

*** durch AL, B' und B'' und RB' und sub-RB'

Abbildungen 5.3.1.1a und b

Die dosisabhängigen Raten geschädigter menschlicher Lymphozyten (PERCENT DAMAGED CELLS) 2, 4, 6 und 8 Stunden (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung in der G2-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.1.1a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.1.1b) Koffeinbehandlung, dargestellt durch die integrierte Exponentialfunktion:

$$Y = 1 - e^{-aD + bD^2}$$

Darin bedeuten:

Y	Raten geschädigter Zellen (PERCENT DAMAGED CELLS),
D	Dosis (DOSE) und
a und b	Parameter der Funktion.

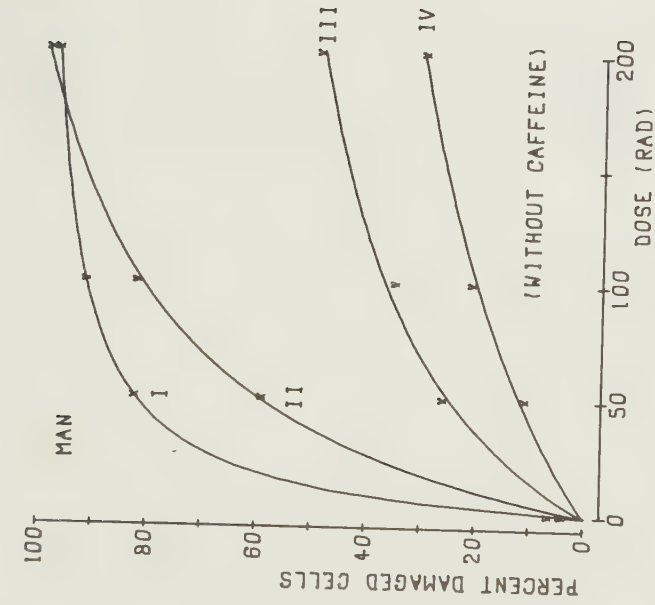


Abbildung 5.3.1.1b

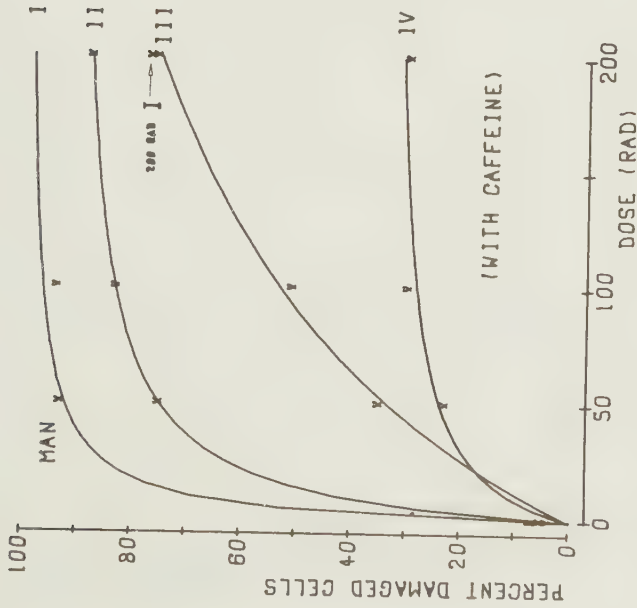


Abbildung 5.3.1.1a

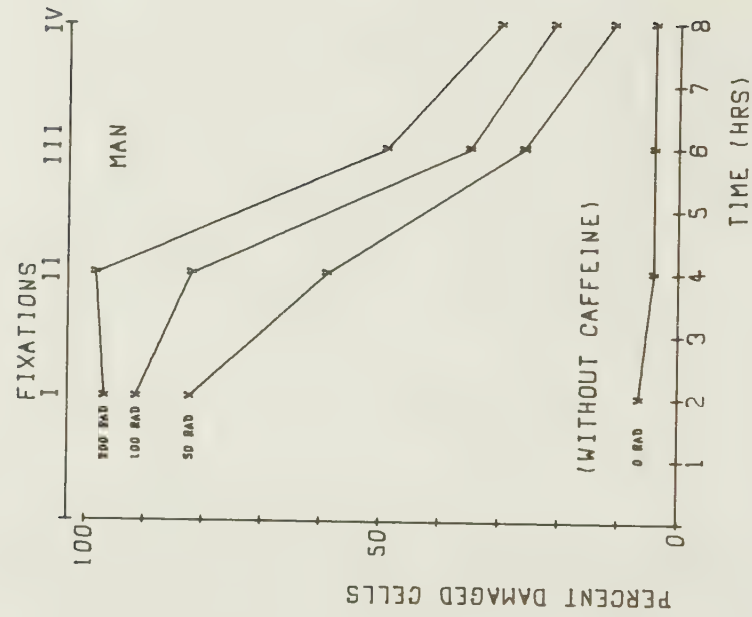


Abbildung 5.3.1.2b

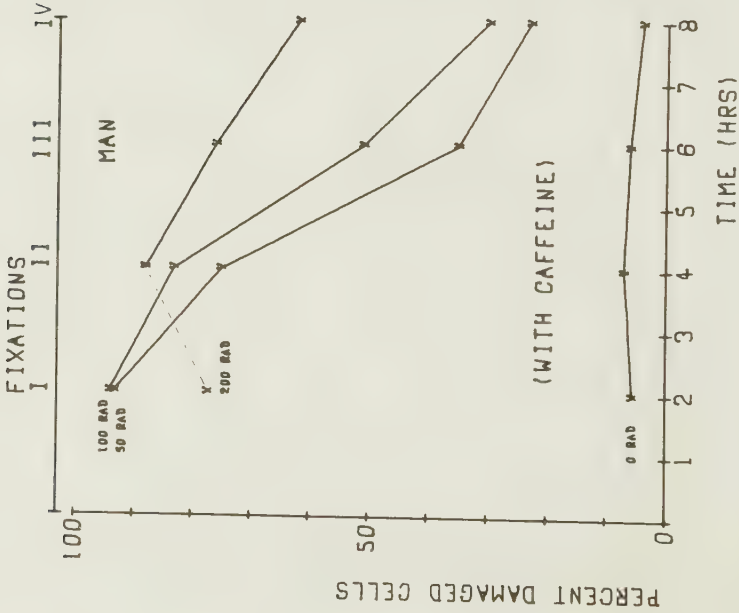


Abbildung 5.3.1.2a

Abbildungen 5.3.1.2a und b

Die zeitabhängigen Raten geschädigter menschlicher Lymphozyten (PERCENT DAMAGED CELLS) (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung in der G2-Phase mit 0, 50, 100 und 200 rad, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.1.2a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.1.2b) Koffeinbehandlung

Die Raten der in den Metaphasen menschlicher Lymphozyten beobachteten Aberrationen sind in Tabelle 5.3.1.2 aufgeführt. In den Kontrollen treten achromatische Läsionen (AL) zwischen 0,02 und 0,05 pro Zelle auf. Die Bruchraten ($B' + B''$) bewegen sich zwischen 0,01 und 0,03 pro Zelle; eine zeitliche Abhängigkeit der Raten achromatischer Läsionen und Brüche besteht nicht.

Chromatiden- (RB') und Subchromatidentranslokationen ($sub-RB'$) sind in Metaphasen unbestrahlter Lymphozyten nicht aufgetreten. In den bestrahlten Lymphozyten nehmen die dosisabhängigen Raten achromatischer Läsionen und Brüche mit zunehmender Kulturdauer ab, wobei sich unbehandelte und koffeinierte Zellen bezüglich dieser Aberrationsformen nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Lediglich bei 200 rad sind die AL- und Bruchraten in koffeinierten Zellen über den gesamten Fixierungszeitraum hinweg niedriger als für unbehandelte.

Die Translokationsraten ($RB' + sub-RB'$) steigen, soweit es die mit 200 rad bestrahlten Zellen betrifft, zwischen der ersten und zweiten Fixierung auf etwa doppelt so hohe Werte an. Bis zu diesem Zeitpunkt (4 Stunden nach Bestrahlung) treten zwischen unbehandelten und behandelten Zellen keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich dieser Aberrationsraten auf. Für die Fixierungen III und IV ergeben sich in den behandelten Lymphozyten jedoch höhere RB' -Raten als in unbehandelten Zellen.

Tabelle 5.3.1.2

Die dosisabhängigen Raten achromatischer Läsionen (AL), offener Chromatid-Translokationen (RB' und sub-RB') nach Bestrahlung menschlicher Lymphozyten

Fix.*	Dosis (rad)	Anzahl Zellen		Anzahl Aberrationen							
		+**	-**	AL				B' B''			
				+		-		+		-	
I	0	200	140	10	0,05	6	0,04	6	0	4	0
	50	130	180	199	1,53	308	1,68	305	3	321	3
	100	98	116	380	3,88	345	2,97	510	8	482	4
	200	101	92	453	4,49	508	5,52	643	6	731	9
II	0	100	100	4	0,04	4	0,04	3	0	1	0
	50	100	100	57	0,57	53	0,53	125	1	131	0
	100	136	150	192	1,41	194	1,29	334	3	359	3
	200	125	59	439	3,51	288	4,88	754	13	408	1
III	0	100	100	2	0,02	5	0,05	3	0	1	0
	50	100	100	13	0,13	11	0,11	37	1	36	0
	100	100	100	26	0,26	34	0,34	107	1	91	2
	200	100	100	72	0,72	129	1,29	201	4	273	2
IV	0	100	100	2	0,02	2	0,02	2	0	2	0
	50	100	100	11	0,11	3	0,03	18	2	14	1
	100	100	100	15	0,15	6	0,06	39	0	26	0
	200	100	100	46	0,46	48	0,48	109	2	98	3

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

und Isochromatidbrüche (B' und B''), sowie Chromatid- und Subchromatid- in der G2-Phase des Zellzyklus und gleichzeitiger Behandlung mit Koffein

Aberrationen pro Zelle												
B' + B'' ***				RB' sub-RB'				RB' + sub-RB' ****				
+		-		+		-		+		-		
6	0,03	4	0,03									
311	2,39	327	1,82	31	22	30	44	53	0,41	74	0,41	
526	5,36	490	4,22	30	30	36	42	60	0,61	78	0,67	
655	6,49	749	8,14	58	25	47	28	83	0,82	75	0,82	
3	0,03	1	0,01									
127	1,27	131	1,31	21	12	18	10	33	0,33	28	0,28	
340	2,5	365	2,43	42	35	48	56	77	0,57	104	0,69	
780	6,42	410	6,95	89	94	23	90	183	1,46	113	1,92	
3	0,03	1	0,01									
39	0,39	36	0,36	9	2	5	0	11	0,11	5	0,05	
109	1,09	95	0,95	16	4	11	6	20	0,2	17	0,17	
209	2,09	277	2,77	31	8	18	8	39	0,39	26	0,26	
2	0,02	2	0,02									
22	0,22	16	0,16	11	0	0	2	11	0,11	2	0,02	
39	0,39	26	0,26	10	0	2	2	10	0,1	4	0,04	
113	1,13	104	1,04	41	6	15	2	47	0,47	17	0,17	

*** Summe der offenen Chromatidbrüche (B'=1, B''=2)
 **** Summe der an Translokationen beteiligten Brüche
 (RB' = reunited breaks)

Die Raten achromatischer Läsionen, offener Chromatidbrüche und chromatidaler und subchromatidaler Translokationen aus Tabelle 5.3.1.2 sind für koffeinierte und unbehandelte Lymphozyten in den Abbildungen 5.3.1.3a und b (AL), 5.3.1.4a und b (B' + B'') und 5.3.1.5a und b (RB' + sub-RB') als Zeit-Effekt-Beziehungen dargestellt.

Es ist zu erkennen, daß die Bruch- und AL-Raten für die Dosen 50 und 100 rad relativ gleichförmig abnehmen und nach 8 Stunden (Fixierung IV) auf das Niveau der Kontrollen absinken. Bei den mit 200 rad bestrahlten Zellen ergibt sich eine ungleichförmige Veränderung der Raten. Sie sinken zwischen der ersten und der zweiten Fixierung zunächst langsam ab, wobei zu beobachten ist, daß die für diese beiden Fixierungen gefundenen Aberrationsraten in koffeinierten Zellen niedriger waren als in den unbehandelten. Nach der zweiten Fixierung ist ein sehr steiler Abfall der Raten zu beobachten. Die 8 Stunden nach Bestrahlung ermittelten AL- und Bruch-Raten sind für behandelte und unbehandelte Zellen nahezu gleich groß, liegen jedoch in den mit 200 rad bestrahlten Zellen bei der vierten Fixierung über den Endraten der übrigen Dosen. Dieser Effekt, sowie das anfänglich geringere Absinken der Aberrationsraten deuten auf eine Verzögerung der G₂-Phase hin. Darüberhinaus kann hierfür das Absterben eines beträchtlichen, bei dieser Dosis möglicherweise übermäßig geschädigten Teils der Zellen (cell killing) verantwortlich sein. Beide Überlegungen führen zu der Annahme, daß sich die mit 200 rad bestrahlten Lymphozyten zum jeweiligen Fixierungszeitpunkt in einem späteren G₂-Phase-Stadium befunden haben als die mit niedrigeren Dosen bestrahlten Zellen.

Die Translokationsraten ($RB' + \text{sub-}RB'$) steigen bei 200 rad bis zur zweiten Fixierung in koffeinierten (Abb. 5.3.1.5a), wie auch in unbehandelten Lymphozyten (Abb. 5.3.1.5b) sehr steil an und fallen danach ebenso steil wieder ab, was auf ein Maximum der Reparaturaktivität bei etwa der 4. Stunde nach Bestrahlung (Fix. II) hinweist.

In der Tendenz ist dieser Effekt auch bei den Dosen 50 rad und 100 rad anzunehmen, geht man davon aus, daß sich die jeweiligen Maxima, aufgrund einer proportional zur Dosis geringeren Verzögerung der G₂-Phase, zwischen der ersten und zweiten Fixierung befunden haben und daher nicht als solche zu erfassen waren.

Abbildungen 5.3.1.3a und b

Die Raten achromatischer Läsionen (ACHROMATIC LESIONS / CELL) in Metaphasen menschlicher Lymphozyten, in Abhängigkeit von der Fixierungszeit (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung mit 0, 50, 100 und 200 rad in der G₂-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.1.3a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.1.3b) Koffeinbehandlung (AL-Werte aus Tabelle 5.3.1.2)

Abbildungen 5.3.1.4a und b

Die Raten offener Chromatidbrüche (OPEN BREAKS / CELL) in den Metaphasen menschlicher Lymphozyten, in Abhängigkeit von der Fixierungszeit (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung mit 0, 50, 100 und 200 rad in der G₂-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.1.4a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.1.4b) Koffeinbehandlung (Werte ($B' + B''$) aus Tabelle 5.3.1.2)

Abbildungen 5.3.1.5a und b

Die Translokationsraten (REUNITED BREAKS / CELL) in den Metaphasen menschlicher Lymphozyten, in Abhängigkeit von der Fixierungszeit (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung mit 0, 50, 100 und 200 rad in der G₂-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.1.5a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.1.5b) Koffeinbehandlung (Werte ($RB' + \text{sub-}RB'$) aus Tabelle 5.3.1.2)

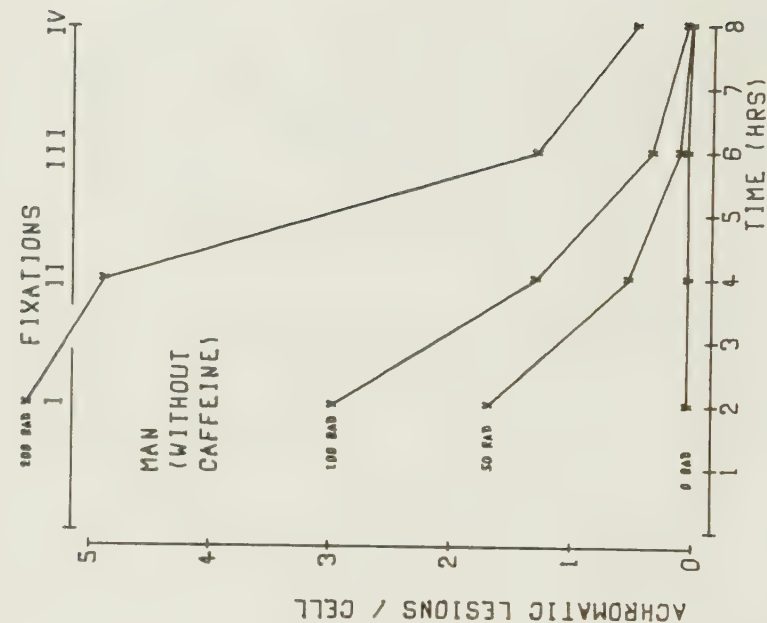


Abbildung 5.3.1.3b

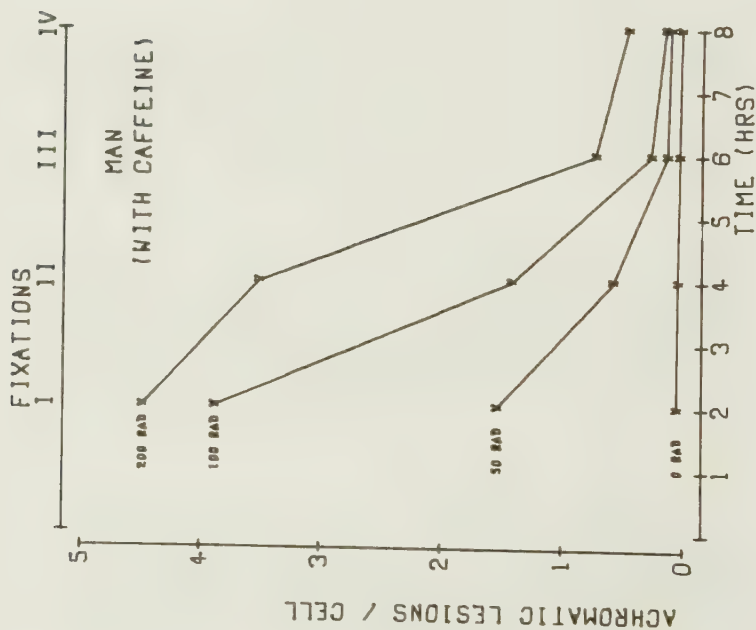


Abbildung 5.3.1.3a

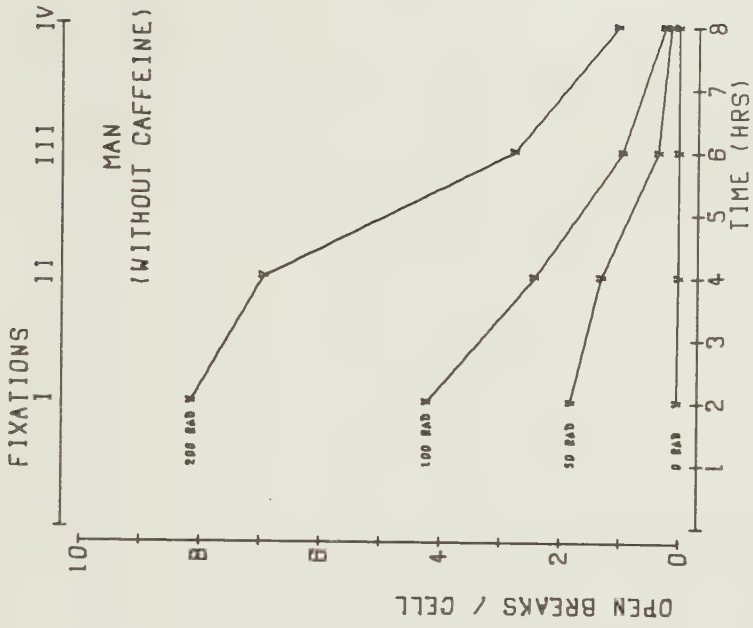


Abbildung 5.3.1.4b

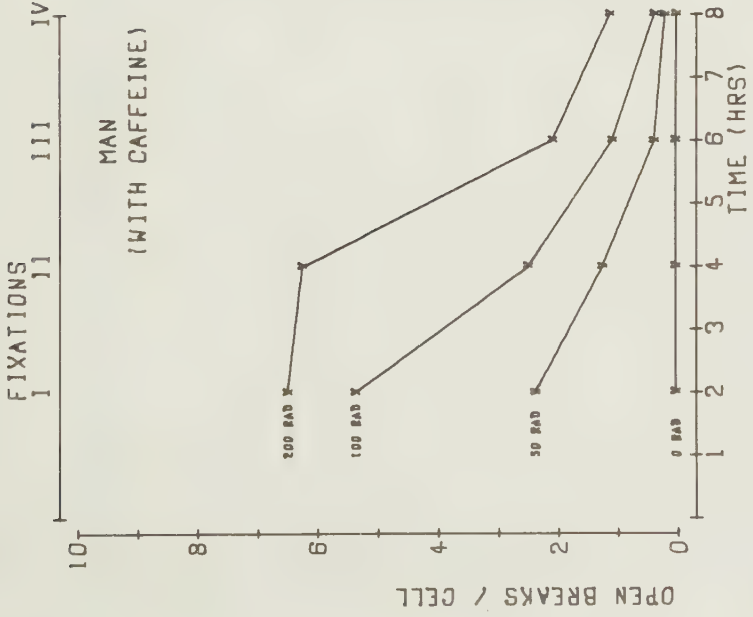


Abbildung 5.3.1.4a

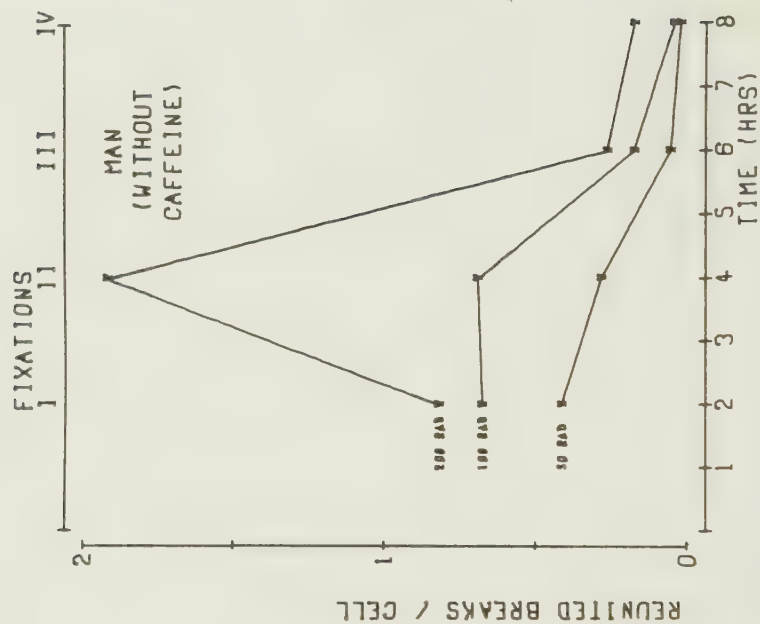


Abbildung 5.3.1.5b



Abbildung 5.3.1.5a

Tabelle 5.3.1.3

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die dosisabhängigen Raten achromatischer Läsionen (AL), offener Chromatid- und Isochromatidbrüche (B' und B''), sowie chromatidaler und subchromatidaler Translokationen (RB' und sub-RB') nach Bestrahlung menschlicher Lymphozyten in der G2-Phase des Zellzyklus

Fix.* (rad)	Dosis (rad)	Anzahl Zellen +** -**	Aberrationen pro Zelle Koeffizientfaktor (CF = $\frac{+}{-}$)											
			AL		Mittelw. (+ SE)	B' + B''***		Mittelw. (+ SE)		RB' + sub-RB'****		Mittelw. (+ SE)		
			+	-	CF		+	-	CF		+	-	CF	
I	0	200	140	0,05 / 0,04 = 1,25		0,03 / 0,03 = 1					0,41 / 0,41 = 1			0,96
	50	130	180	1,53 / 1,68 = 1,1		2,39 / 1,82 = 1,31				1,1	0,61 / 0,67 = 0,88			(0,04)
	100	98	116	3,88 / 2,97 = 1,31	(0,11)	5,36 / 4,22 = 1,27	(0,12)							
	200	101	92	4,49 / 5,52 = 0,81		6,49 / 8,14 = 0,8					0,82 / 0,82 = 1			
II	0	100	100	0,04 / 0,04 = 1		0,03 / 0,01 = 3					0,33 / 0,28 = 1,18			0,92
	50	100	100	0,57 / 0,53 = 1,08		1,27 / 1,31 = 0,97				1,48	0,57 / 0,69 = 0,83			(0,13)
	100	136	150	1,41 / 1,29 = 1,09	(0,09)	2,5 / 2,43 = 1,03	(0,51)				1,46 / 1,92 = 0,76			
	200	125	59	3,51 / 4,88 = 0,72		6,42 / 6,95 = 0,92								
III	0	100	100	0,02 / 0,05 = 0,4		0,03 / 0,01 = 3					0,11 / 0,05 = 2,2			1,63
	50	100	100	0,13 / 0,11 = 1,18		0,39 / 0,36 = 1,08				1,5	0,2 / 0,17 = 1,18			(0,30)
	100	100	100	0,26 / 0,34 = 0,76	(0,17)	1,09 / 0,95 = 1,15	(0,51)				0,39 / 0,26 = 1,5			
	200	100	100	0,72 / 1,29 = 0,56		2,09 / 2,77 = 0,75								
IV	0	100	100	0,02 / 0,02 = 1		0,02 / 0,02 = 1					0,11 / 0,02 = 2,2			2,49
	50	100	100	0,11 / 0,03 = 3,67		0,22 / 0,16 = 1,38				1,24	0,1 / 0,04 = 2,5			(0,16)
	100	100	100	0,15 / 0,06 = 2,5	(0,66)	0,39 / 0,26 = 1,5	(0,12)				0,47 / 0,17 = 2,76			
	200	100	100	0,46 / 0,48 = 0,94		1,13 / 1,04 = 1,09								

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

*** Summe der offenen Chromatidbrüche (B'=1, B''=2)

**** Summe der an Translokationen beteiligten Brüche (RB' = reunited breaks)

SE = mittlerer Fehler
CF = caffeine factor
(1 = no effect level)

Ergänzend zu Tabelle 5.3.1.2 sind in Tabelle 5.3.1.3 außer den Raten der unterschiedlichen Aberrationsformen noch die für jede Dosis berechneten Koffeinfaktoren (CF), sowie die sich daraus für jede Fixierung ergebenden Mittelwerte angegeben. Es zeigt sich dabei, daß Koffein auf die AL-Raten praktisch keinen und auf die B'-Raten einen nur geringen Einfluß hat. Die jeweiligen Mittelwerte der Fixierungen I, II, III und IV, berücksichtigt man deren entsprechende Fehler (SE), bewegen sich um den Faktor "1" (1 = no effect level). Für die Translokationsraten (RB' und sub-RB') ist nach der ersten Fixierung eine Erhöhung der mittleren CF-Werte von $0,96 \pm 0,04$ auf $2,49 \pm 0,16$ bei der vierten Fixierung zu verzeichnen, was mehr als einer Verdoppelung gleichkommt.

In Tabelle 5.3.1.4 erfolgt die gesonderte Aufstellung der Raten chromatidaler und subchromatidaler Translokationen. Neben den jeweils für RB' und für sub-RB' gefundenen Raten sind die Koffeinfaktoren je Dosis, sowie deren je Fixierung errechneten Mittelwerte $\pm$ SE angegeben. Die Raten beider Aberrationsformen nehmen mit steigender Dosis zu. Bei den Fixierungen III und IV liegen die nach Koffeinbehandlung aufgetretenen RB'-Raten deutlich über denen unbehandelter Zellen, was sich in erhöhten CF-Werten ausdrückt. Diese steigen im Mittel von $1,18 \pm 0,12$ nach der ersten Fixierung auf $3,87 \pm 1,13$ bei der vierten Fixierung an. Auf die Raten der sub-RB' hat Koffein einen eher negativen Einfluß. Die Mittelwerte, soweit sie berechenbar waren, liegen zwischen $0,79 \pm 0,05$ (Fix. I) und $0,84 \pm 0,16$ (Fix. III). Der CF-Wert für Fixierung IV (1 ± 1) stellt keinen echten Mittelwert dar, da seiner Berechnung lediglich ein einzelner, von Null verschiedener Wert bei 200 rad zugrundeliegt.

Tabelle 5.3.1.4

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die dosisabhängigen Raten chromatidaler (RB') und subchromatidaler Translokationen (sub-RB') nach Bestrahlung menschlicher Lymphozyten in der G2-Phase des Zellzyklus und auf das Verhältnis beider Aberrationsformen zueinander

Fix.* Dosis (rad)	Anzahl Zellen +** -**	Translokationen pro Zelle				Koffeineffekt ($CF = \frac{+}{-}$)		RB' sub-RB'	
		+	-	CF	Mittelw. (+ SE)	+	-	Mittelw. (+ SE)	Mittelw. (+ SE)
I	50	130	180	0,24 / 0,17 = 1,41	1,41	0,17 / 0,24 = 0,71	1,41	0,71	1,41
	100	98	116	0,31 / 0,31 = 1	1,18	0,31 / 0,36 = 0,86	1	1,56	0,86
	200	101	92	0,57 / 0,51 = 1,12	(0,12)	0,25 / 0,31 = 0,81	2,28	(0,38)	1,65
II	50	100	100	0,21 / 0,18 = 1,17	1,17	0,12 / 0,1 = 1,2	1,75	1,8	1,8
	100	136	150	0,31 / 0,32 = 0,97	1,32	0,26 / 0,37 = 0,7	1,19	1,3	0,86
	200	125	59	0,71 / 0,39 = 1,82	(0,25)	0,75 / 1,53 = 0,49	0,95	(0,24)	0,25
III	50	100	100	0,09 / 0,05 = 1,8	1,8	0,02	4,5	1	4,5
	100	100	100	0,16 / 0,11 = 1,45	1,66	0,04 / 0,06 = 0,67	4	4,13	1,83
	200	100	100	0,31 / 0,18 = 1,72	(0,10)	0,08 / 0,08 = 1	3,88	(0,19)	2,25
IV	50	100	100	0,11	0	0 / 0,02 = 0	1	0	1
	100	100	100	0,1 / 0,02 = 5	3,87	0 / 0,02 = 0	1	6,83	1
	200	100	100	0,41 / 0,15 = 2,73	(1,13)	0,06 / 0,02 = 3	(1)	7,5	(2,35)

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.
 ** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein;
 *** Summe der an Chromatidentranslokationen beteiligten Brüche;
 **** Summe der an Subchromatidentranslokationen beteiligten Brüche

SE = mittlerer Fehler
 CF = caffeine factor
 (1 = no effect level)

Die vom "no effect level" kaum abweichenden CF-Werte, sowie die Tatsache, daß die sub-RB'-Raten in behandelten wie unbehandelten Lymphozyten in gleichem Maße abnehmen, lassen erkennen, daß Koffein auf die Reparatur (Reunion) von Subchromatidbrüchen keinen Einfluß hat. Es ist daher anzunehmen, daß die Formierung von sub-RB', die kurz vor Eintritt der Zellen in die Mitose beziehungsweise in der frühen Prophase erfolgt (4.4.2c), stattgefunden hat, ohne daß das Koffein wirksam werden konnte. Diese Annahme wird außerdem noch durch das Verhältnis RB' zu sub-RB' (Tabelle 5.3.1.4) belegt. Dies nimmt ab der dritten Fixierung zu und steigt dabei nach Koffeinbehandlung auf etwa das Doppelte im Vergleich zu unbehandelten Zellen an. Die in den späteren Fixierungen (III und IV) noch zu beobachtenden sub-RB' befinden sich demnach in Zellen, die durch Strahleneinwirkung verzögert in die Mitose eingetreten sind. Nach der zweiten Fixierung hat der überwiegende Teil der sub-RB' enthaltende Zellen die Mitose bereits durchlaufen und entzieht sich somit einer Auswertung.

Welchen Einfluß Koffein auf die Reparatur während der G2-Phase hat, ist zahlenmäßig in Tabelle 5.3.1.5 dargestellt. Als Maß für die Reparatur ist darin die Relation der RB'- zu B'-Raten (Reunionsfaktor = relative Reparatur) angegeben. Die RB'-Raten enthalten ausschließlich die Werte für "Interchange", sowie für die nur selten aufgetretene "Sisterstrand Union" (SU) und für "Intrachange" (4.4.2b). Die sub-RB'-Raten können nicht mit in die Berechnung dieses Reunionfaktors eingehen, da in Bezug auf ihre Ursache (Subchromatidbrüche waren auswertungsmäßig nicht erfaßbar) keine quantitative Aussage gemacht werden kann.

Tabelle 5.3.1.5

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die relative Reparatur nach Bestrahlung menschlicher Lymphozyten in der G₂-Phase des Zellzyklus, ausgedrückt durch das Verhältnis der Raten vereiniger und offener Chromatidbrüche

Fix.*	Dosis (rad)	Anzahl Zellen +** -**	Aberrationen pro Zelle			relative Reparatur			Mittelw. ($\pm$ SE)	CF	Mittelw. ($\pm$ SE)
			RB'*** +	RB'*** -	B' + B''**** + -	Mittelw. ($\pm$ SE)	-	Mittelw. ($\pm$ SE)			
I	50	130	0,24	0,17	2,39	1,82	0,1	/ 0,09	= 1,18		
	100	98	0,31	0,31	5,36	4,22	0,06	/ 0,07	= 0,86		1,18
	200	101	0,57	0,51	6,49	8,14	0,09	/ 0,06	= 1,5		(0,18)
II	50	100	0,21	0,18	1,27	1,31	0,17	/ 0,14	= 1,21		
	100	136	0,31	0,32	2,5	2,43	0,12	/ 0,13	= 0,92		1,44
	200	125	0,71	0,39	6,42	6,95	0,11	/ 0,05	= 2,2		(0,39)
III	50	100	0,09	0,05	0,39	0,36	0,23	/ 0,14	= 1,64		
	100	100	0,16	0,11	1,09	0,95	0,15	/ 0,12	= 1,25		1,8
	200	100	0,31	0,18	2,09	2,77	0,15	/ 0,06	= 2,5		(0,37)
IV	50	100	0,11	0	0,22	0,16	0,5	/ 0	= 3,25		2,88
	100	100	0,1	0,02	0,39	0,26	0,26	/ 0,08	= 2,5		(0,37)
	200	100	0,41	0,15	1,13	1,04	0,35	/ 0,14	= 2,5		(0,37)

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

*** Summe der an Chromatidentranslokationen beteiligten Brüche

**** Summe der offenen Chromatidbrüche (B'=1, B''=2)

SE = mittlerer Fehler
CF = caffeine factor
(1 = no effect level)

$\frac{RB'}{B'}$ = Reunionsfaktor

Wie aus Tabelle 5.3.1.5 hervorgeht, sind die Reunionsfaktoren für die Dosen 50, 100 und 200 rad innerhalb einer Fixierung nahezu gleich. Für die relative Reparatur in bestrahlten Lymphozyten, die nicht mit Koffein behandelt worden waren, ergeben sich je Fixierung Mittelwerte zwischen 0,07 und 0,11; die mittleren Fehler (SE) dieser Werte liegen zwischen $\pm 0,01$ und $\pm 0,04$. Bei koffeinierten Zellen erhöhen sich die gemittelten Reunionsfaktoren nach der ersten Fixierung von $0,08 \pm 0,01$ auf $0,37 \pm 0,07$ bei der vierten Fixierung.

Vergleicht man die mittleren Reunionsfaktoren behandelter und unbehandelter Zellen aus der Fixierung IV miteinander, so ist unter Koffeineinfluß mehr als eine Verfünffachung der relativen Reparatur festzustellen. Damit die Standardabweichung der Einzelwerte von ihren Mittelwerten berücksichtigt werden konnte, war es jedoch erforderlich die Koffeinfaktoren anhand der einzelnen, je Dosis berechneten Reunionsfaktoren zu bestimmen. Für die jeweiligen Fixierungen wurden danach CF-Werte ermittelt, die von $1,18 \pm 0,18$ (Fix. I) auf $2,88 \pm 0,37$ (Fix. IV) ansteigen.

Für den Nachweis eines Einflusses des Koffeins auf die Dauer der G₂-Phase und damit möglicherweise auf die, der Zelle für die Reparatur verfügbare Zeit, wurden für jede Fixierung und je Dosis die Raten markierter Metaphasen (MI = Markierungsindex) ermittelt. Von den autoradiographierten Präparaten wurden dazu jeweils 100 Metaphasen hinsichtlich einer Markierung der Chromosomen durch Silberkörnchen als Folge der Behandlung mit tritiiertem Thymidin (2.4) ausgewertet. Das Ergebnis dieser Auswertung ist in Tabelle 5.3.1.6 festgehalten.

Tabelle 5.3.1.6

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die Raten radioaktiv markierter Metaphasen (MI) menschlicher Lymphozyten nach Bestrahlung in der G2-Phase (Es wurden jeweils 100 Zellen ausgewertet.)

Fix.*	Dosis (rad)	MI (% markierte Metaphasen)		CF = $\frac{+}{-}$	
		+++	-**	CF	Mittelwerte (+ SE)
I	0	0	0		
	50	0	0		
	100	0	0		
	200	0	0		
II	0	12	13	= 0,92	
	50	8	3	= 2,67	1,8
	100	1	0		(0,87)
	200	0	0		
III	0	40	35	= 1,14	
	50	33	27	= 1,22	2,32
	100	21	23	= 0,91	(1,23)
	200	24	4	= 6	
IV	0	54	45	= 1,2	
	50	46	45	= 1,02	1,16
	100	39	31	= 1,26	(0,05)
	200	35	30	= 1,17	

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung. SE = mittlerer Fehler
 ** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein CF = caffeine factor
 (1 = no effect level) MI = Markierungsindex

Die gemittelten CF-Werte $\pm$ SE liegen bei $1,8 \pm 0,87$ (Fix. II), $2,32 \pm 1,23$ (Fix. III) und $1,16 \pm 0,05$ (Fix. IV). Ein Einfluß von Koffein auf die Markierungsindizes läßt sich jedoch aus diesen Werten angesichts der relativ großen mittleren Fehler nicht ableiten.

Deutlich dagegen wird der Einfluß der Bestrahlung auf die Raten markierter Metaphasen, indem die Markierungsindizes innerhalb der einzelnen Fixierungen mit steigender Dosis abnehmen.

In den Präparaten der ersten Fixierung traten keine markierten Metaphasen auf. Es ist daher anzunehmen, daß sich diese Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G2-Phase befunden haben. In den folgenden Fixierungen nehmen die dosisabhängigen Markierungsindizes mit steigender Fixierungszeit zu. Die kultivierten Lymphozyten durchlaufen zwischen Bestrahlung und Fixierung die G2-Phase und die Mitose bis zur Metaphase. Je später die Präparation erfolgte, desto mehr markierte Zellen (S-Phase-Zellen) traten in den Autoradiographien auf. Der Markierungsindex kann daher als ein Maß für den G2-Phase-Verlauf gelten: hohe Markierungsindizes weisen auf ein frühes und niedrige auf ein spätes G2-Phase-Stadium hin. Ein mit steigender Dosis abnehmender Markierungsindex bedeutet demnach eine strahlenbedingte Verzögerung der G2-Phase. Allerdings kann dieser Effekt auch auf einem durch die Bestrahlung hervorgerufenen, dosisabhängigen Absterben der Zellen (cell killing) während der S-Phase beruhen.

5.3.2 Schimpanse

Die Bestrahlung der Schimpansenlymphozyten erfolgte nach einer Kultivierung von 60 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt treten in den Kulturen erste (M1), zweite (M2) und dritte (M3) Mitosen mit etwa gleicher Häufigkeit auf (5.1.2). Entsprechend dem Versuchsplan C (3.4) wurden die Kulturen nach 61, 62, 64 und 66 Stunden aufgearbeitet. Unmittelbar nach der Bestrahlung erhielt jede Kultur tritiiertes Thymidin (2.4) zur radioaktiven Markierung der Zellen, die ihre DNS-Replikation (S-Phase) noch nicht

beendet hatten. Danach wurden die jeweiligen Parallelkulturen mit Koffein (2.6) behandelt. Die Versuche wurden mit dem Blut des Spenders "Cb" durchgeführt.

Die Auswertungsergebnisse für die Raten der geschädigten Zellen sind in Tabelle 5.3.2.1 dargestellt. Als geschädigt wurden alle die Zellen in der Auswertung erfaßt, in deren Metaphasen achromatische Läsionen (AL), offene Chromatidbrüche (B' und B'') oder Translokationen (RB' und sub-RB') auftraten.

Tabelle 5.3.2.1

Die dosisabhängigen Raten geschädigter Schimpansenlymphozyten nach Bestrahlung in der G2-Phase und gleichzeitiger Behandlung mit Koffein

Fix.*	Dosis (rad)	Anzahl Zellen				Anzahl Zellen % Zellen			
		insgesamt		normal		geschädigt***			
		***	-**	+	-	+		-	
I	0	100	100	94	96	6	6	4	4
	50	100	100	21	22	79	79	78	78
	100	100	100	8	9	92	92	91	91
	200	102	56	3	0	99	97,1	56	100
II	0	100	100	92	92	8	8	8	8
	50	100	100	41	43	59	59	57	57
	100	100	100	21	22	79	79	78	78
	200	100	100	2	9	98	98	91	91
III	0	100	100	91	94	9	9	6	6
	50	100	100	40	55	60	60	45	45
	100	136	100	48	40	88	64,7	60	60
	200	100	100	8	36	92	92	64	64
IV	0	100	100	96	95	4	4	5	5
	50	100	100	45	65	55	55	35	35
	100	114	21	47	12	67	58,8	9	42,9
	200	100	100	24	46	76	76	54	54

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 1, 2, 4 und 6 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

*** durch AL, B' und B'' und RB' und sub-RB'

Für Fixierung I sind in koffeinierten (+) wie unbehandelten (-) Kulturen nahezu die gleichen Raten geschädigter, nicht markierter Zellen zu verzeichnen. Ab der zweiten Fixierung (II) sinken die Schädigungsraten nach Koffeinbehandlung langsamer ab als in unbehandelten Kulturen. Bei allen Fixierungen nehmen die Raten geschädigter Zellen mit steigender Dosis zu.

Unbehandelte Kontrollen weisen zwischen 4 und 8 % geschädigte Zellen auf; nach Koffeinbehandlung liegen die Raten zwischen 4 und 9 %. Die durch 200 rad verursachten Schädigungsraten sinken in behandelten Kulturen von 97,1 % (Fix. I) auf 76 % (Fix. IV), und bei unbehandelten Lymphozyten nehmen die Raten geschädigter Zellen von 100 % (Fix. I) auf 54 % ab.

Die dosisabhängigen Raten geschädigter Schimpansenlymphozyten sind in Abbildung 5.3.2.1a für koffeinierte und in Abbildung 5.3.2.1b für unbehandelte Kulturen dargestellt, und der zeitliche Einfluß auf diese Raten ist in Abbildung 5.3.2.2a (mit Koffein) und Abbildung 5.3.2.2b (ohne Koffein) veranschaulicht.

Abbildungen 5.3.2.1a und b

Die dosisabhängigen Raten geschädigter Schimpansenlymphozyten (PERCENT DAMAGED CELLS) 1, 2, 4 und 6 Stunden (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung in der G2-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.2.1a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.2.1b) Koffeinbehandlung, dargestellt durch die integrierte Exponentialfunktion:

$$Y = 1 - e^{-aD + bD^2}$$

Darin bedeuten:

- | | |
|---------|---|
| Y | Raten geschädigter Zellen
(PERCENT DAMAGED CELLS), |
| D | Dosis (DOSE) und |
| a und b | Parameter der Funktion. |

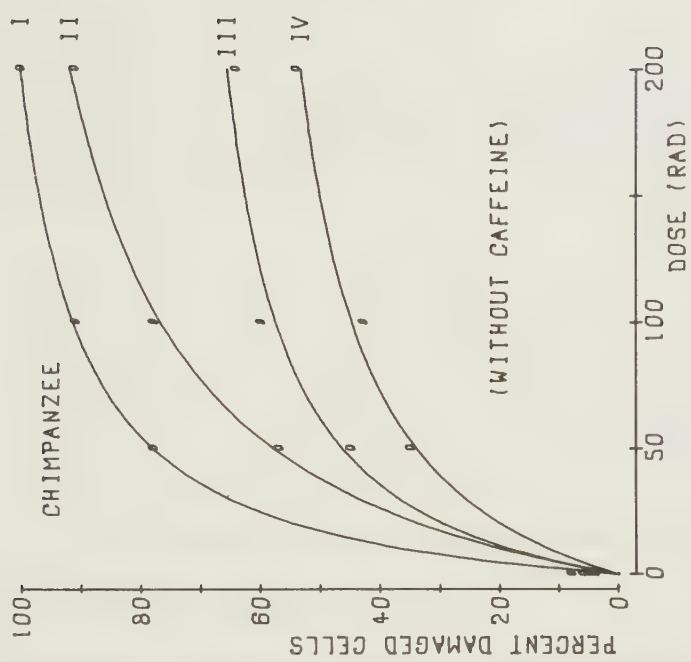


Abbildung 5.3.2.1b

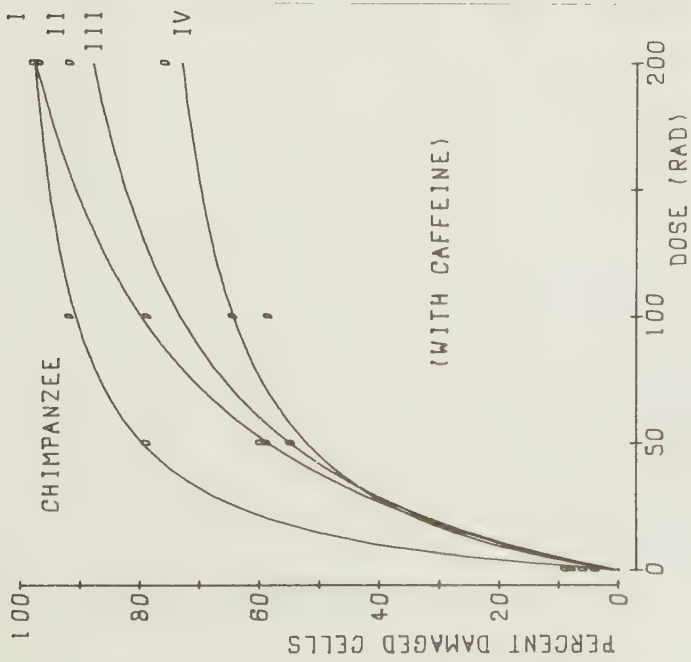


Abbildung 5.3.2.1a

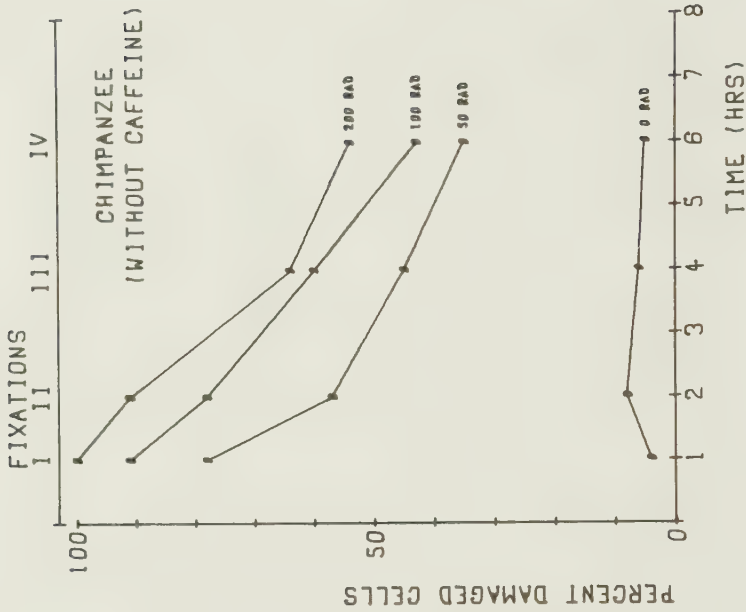


Abbildung 5.3.2.2b

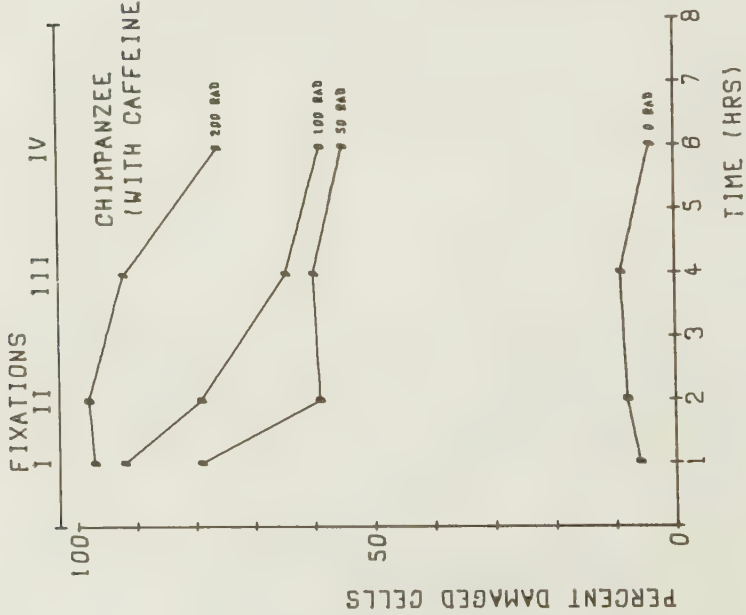


Abbildung 5.3.2.2a

Abbildungen 5.3.2.2a und b

Die zeitabhängigen Raten geschädigter Schimpansenlymphozyten (PERCENT DAMAGED CELLS) (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung in der G₂-Phase mit 0, 50, 100 und 200 rad, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.2.2a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.2.2b) Koffeinbehandlung

In Tabelle 5.3.2.2 sind die Auswertungsergebnisse hinsichtlich der Raten chromatidaler Aberrationen dargestellt. In den Metaphasen unbestrahlter Lymphozyten wurden über den gesamten Fixierungszeitraum (von 1 bis 6 Stunden) hinweg zwischen 0,04 und 0,07 achromatische Läsionen (AL) pro Zelle beobachtet. Offene Chromatidbrüche (B' und B'') traten in Raten von 0,01 bis 0,06 pro Zelle auf. Dabei ergeben sich zwischen koffeinierten und unbehandelten Zellen keine absicherbaren Unterschiede, und aufgrund der Verteilung dieser Werte über die einzelnen Fixierungen ist auch keine zeitliche Abhängigkeit der Raten zu erkennen. In der unbehandelten Kontrolle der zweiten Fixierung, sowie in der koffeinierten Kontrolle der dritten Fixierung ist jeweils ein sub-RB' beobachtet worden.

Bei den bestrahlten und mit Koffein behandelten Schimpansenlymphozyten ergeben sich für die Raten aller ausgewerteter Aberrationen in allen Fixierungen klare Dosis-Effekt-Beziehungen. Für die AL-, sowie für die B'- und B''-Raten ist eine zeitliche Abnahme mit steigender Fixierungszeit festzustellen. Die RB'- und sub-RB'-Raten steigen, und dies gilt besonders für die mit 200 rad bestrahlten Zellen, von der ersten zur zweiten Fixierung auf mehr als das Doppelte an und fallen danach (Fix. III)

Tabelle 5.3.2.2

Die dosisabhängigen Raten achromatischer Läsionen (AL), offener Chromatid-Translokationen (RB' und sub-RB') nach Bestrahlung von Schimpansenlympho-Koffein

Fix.*	Dosis (rad)	Anzahl Zellen		Anzahl Aberrationen							
				AL				B'		B''	
		+++	-**	+		-		+		-	
I	0	100	100	7	0,07	4	0,04	3	0	1	0
	50	100	100	59	0,59	69	0,69	152	0	137	0
	100	100	100	124	1,24	130	1,3	314	2	303	1
	200	102	56	536	5,25	196	3,5	754	5	409	4
II	0	100	100	4	0,04	4	0,04	4	0	3	0
	50	100	100	33	0,33	28	0,28	78	1	77	2
	100	100	100	52	0,52	82	0,82	172	0	192	1
	200	100	100	271	2,71	374	3,74	778	12	618	1
III	0	100	100	6	0,06	4	0,04	6	0	3	0
	50	100	100	27	0,27	26	0,26	77	0	63	1
	100	136	100	44	0,32	24	0,24	157	0	126	0
	200	100	100	136	1,36	137	1,37	258	2	222	0
IV	0	100	100	5	0,05	6	0,06	1	0	1	0
	50	100	100	24	0,24	31	0,31	69	2	35	1
	100	114	21	35	0,31	7	0,33	123	2	6	0
	200	100	100	104	1,04	123	1,23	194	1	209	3

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 1, 2, 4 und 6 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

und Isochromatidbrüche (B' und B''), sowie Chromatid- und Subchromatid-
zyten in der G2-Phase des Zellzyklus und gleichzeitiger Behandlung mit

Aberrationen pro Zelle											
B' + B'' ***				RB' sub-RB'				RB' + sub-RB' ****			
+		-		+		-		+		-	
3	0,03	1	0,01								
152	1,52	137	1,37	16	4	12	8	20	0,2	20	0,2
318	3,18	305	3,05	24	8	29	10	32	0,32	39	0,39
764	7,49	417	7,45	71	28	25	10	99	0,97	35	0,63
4	0,04	3	0,03				2			2	0,02
80	0,8	81	0,81	19	6	20	10	25	0,25	30	0,3
172	1,72	194	1,94	52	18	24	10	70	0,7	34	0,34
802	8,02	620	6,2	225	30	61	28	255	2,55	89	0,89
6	0,06	3	0,03		2			2	0,02		
77	0,77	65	0,65	16	4	9	4	20	0,2	13	0,13
157	1,15	126	1,26	34	12	35	12	46	0,34	47	0,47
262	2,62	222	2,22	81	12	30	4	93	0,93	34	0,34
1	0,01	1	0,01								
73	0,73	37	0,37	15	6	9	6	21	0,21	15	0,15
127	1,11	6	0,29	30	4	2	0	34	0,3	2	0,1
196	1,96	215	2,15	78	6	26	6	84	0,84	32	0,32

*** Summe der offenen Chromatidbrüche (B'=1, B''=2)
**** Summe der an Translokationen beteiligten Brüche
(RB' = reunited breaks)

nahezu ebenso drastisch wieder ab. Zwischen der dritten und vierten Fixierung ist dann nur noch ein geringer Rückgang zu verzeichnen. Diese Feststellungen sind für unbehandelte Zellen (ohne Koffein) nur mit Einschränkungen zu übernehmen.

Für die AL-Raten tritt in der dritten Fixierung eine Diskrepanz bei den Dosen 50 und 100 rad auf; in 100 Zellen traten bei 100 rad 24 AL und bei 50 rad 26 AL auf; der Poisson Fehler (PE) beträgt pro Zelle $\pm 0,05$. Außerdem zeigt sich bei beiden Dosen, zwischen der dritten und vierten Fixierung ein erneuter, wenn auch nur leichter Anstieg der AL-Raten von 0,26 auf 0,31, beziehungsweise von 0,24 auf 0,33 AL pro Zelle.

Die B'- und B''-Raten nehmen zwar mit steigender Fixierungszeit ab, jedoch ist in Fixierung IV, aufgrund einer sehr geringen Zahl auswertbarer Zellen, die Dosisabhängigkeit nicht erfüllt. Bei 100 rad trat mit 6 B' in 21 Zellen = 0,29 B' pro Zelle eine geringere Bruchrate als nach Bestrahlung mit 50 rad auf. Allerdings ist dieser Wert mit einem relativ großen natürlichen Fehler (PE) von $\pm 0,12$ behaftet.

Für die RB'- und sub RB'-Raten ist bei 100 rad, zwischen der ersten und zweiten Fixierung, anstatt einer Erhöhung, eine Verminderung des Dosis-Effekts von 0,39 auf 0,34 pro Zelle eingetreten, in der dritten Fixierung liegt dieser Wert über der 200 rad-Rate, und in der vierten Fixierung beträgt er weniger als der Dosis-Effekt von 50 rad.

Alle diese Unregelmäßigkeiten sind zu konstatieren, lassen sich jedoch systematisch nicht erklären.

Die einzelnen Aberrationsraten aus Tabelle 5.3.2.2 sind in den Abbildungen 5.3.2.3a und b (AL), 5.3.2.4a und b (B' und B'') und 5.3.2.5a und b (RB' und sub-RB') als Zeit-Effekt-Beziehungen graphisch dargestellt. Die Kurvenverläufe zeigen die gleichen Merkmale, wie sie für die menschlichen Lymphozyten (5.3.1) bereits beschrieben wurden:

1. Absinken aller Aberrationsraten für die Dosen 50 und 100 rad auf Werte nahe den Kontrollraten und
2. erhöhte Raten in der vierten Fixierung nach Bestrahlung mit 200 rad;
3. starkes Ansteigen der Translokationsraten (RB' + sub-RB') zwischen der ersten und zweiten Fixierung und
4. anschließender Rückgang in der dritten und vierten Fixierung auf etwa die Ausgangswerte der ersten Fixierung.

Abbildungen 5.3.2.3a und b

Die Raten achromatischer Läsionen (ACHROMATIC LESIONS / CELL) in Metaphasen von Schimpansenlymphozyten, in Abhängigkeit von der Fixierungszeit (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung mit 0, 50, 100 und 200 rad in der G₂-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.2.3a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.2.3b) Koffeinbehandlung (AL-Werte aus Tabelle 5.3.2.2)

Abbildungen 5.3.2.4a und b

Die Raten offener Chromatidbrüche (OPEN BREAKS / CELL) in den Metaphasen von Schimpansenlymphozyten, in Abhängigkeit von der Fixierungszeit (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung mit 0, 50, 100 und 200 rad in der G₂-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.2.4a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.2.4b) Koffeinbehandlung (Werte (B' + B'') aus Tabelle 5.3.2.2)

Abbildungen 5.3.2.5a und b

Die Translokationsraten (REUNITED BREAKS / CELL) in den Metaphasen von Schimpansenlymphozyten, in Abhängigkeit von der Fixierungszeit (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung mit 0, 50, 100 und 200 rad in der G₂-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.2.5a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.2.5b) Koffeinbehandlung (Werte (RB' + sub-RB') aus Tabelle 5.3.2.2)



Abbildung 5.3.2.3b

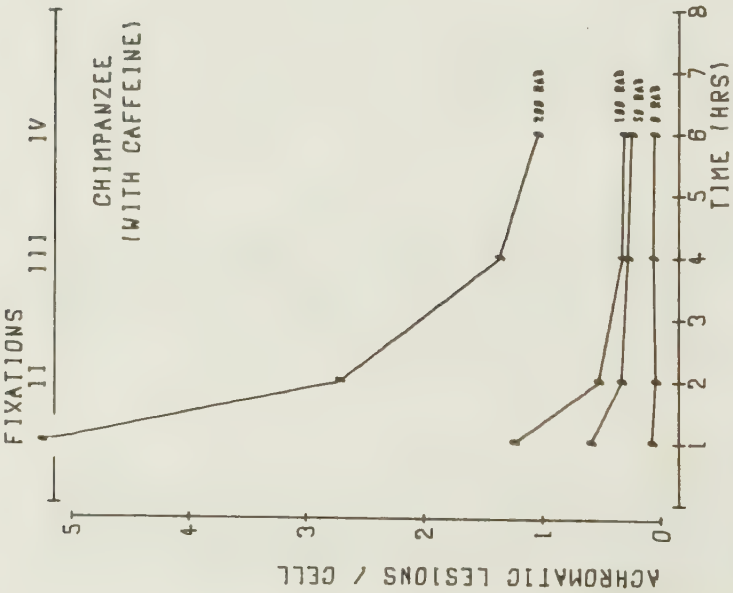


Abbildung 5.3.2.3a

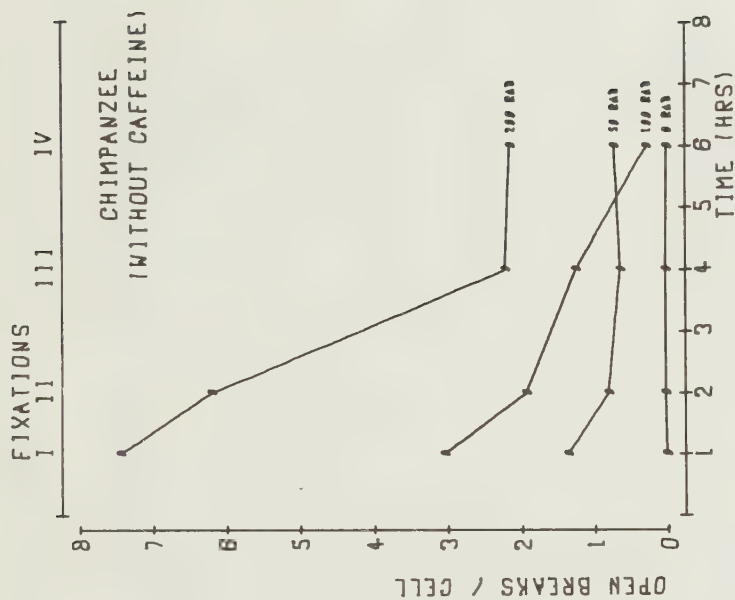


Abbildung 5.3.2.4b

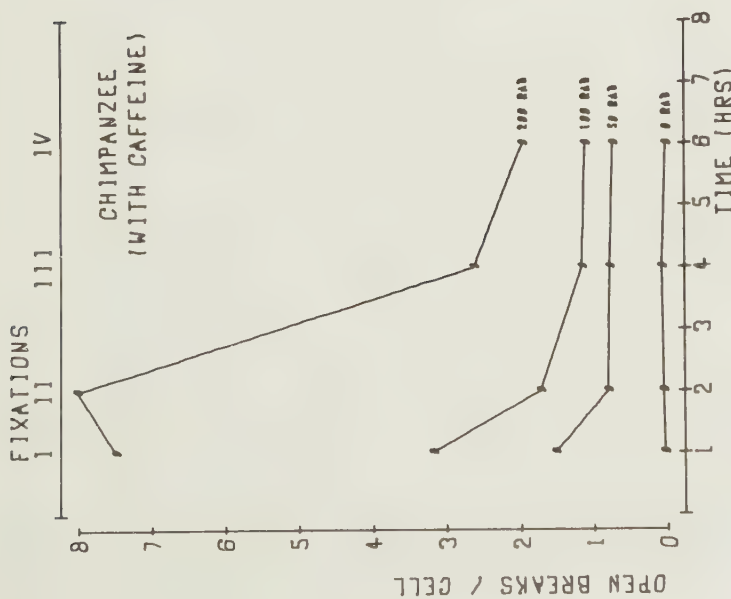


Abbildung 5.3.2.4a

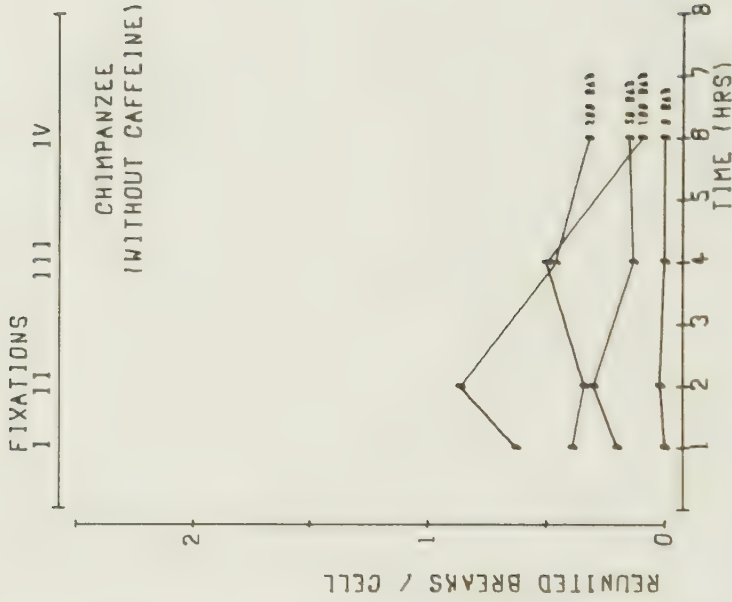


Abbildung 5.3.2.5b

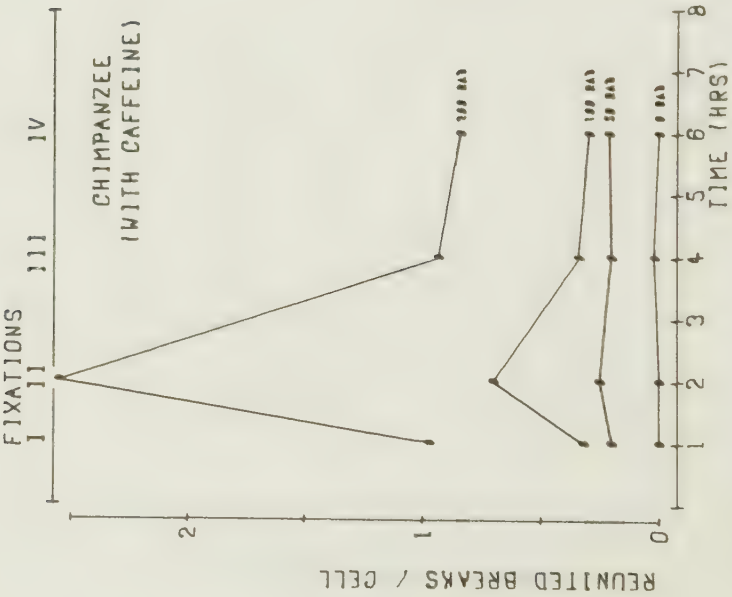


Abbildung 5.3.2.5a

In Tabelle 5.3.2.3 sind die Koffeinfaktoren (CF) für die dosisbezogenen Aberrationsraten und deren, je Fixierung berechnete Mittelwerte mit ihren entsprechenden Fehlern (SE) angegeben.

Für die achromatischen Läsionen läßt sich anhand dieser Mittelwerte kein Effekt des Koffeins ableiten. Die Werte liegen für die erste Fixierung bei $1,27 \pm 0,21$, für die zweite Fixierung bei $0,88 \pm 0,13$, für die dritte Fixierung bei $1,22 \pm 0,12$ und für die vierte Fixierung bei $0,85 \pm 0,04$.

Trotz relativ großer mittlerer Fehler ist für die gemittelten CF-Werte der Bruchraten eine geringfügige Erhöhung gegenüber dem "no effect level" (CF = 1) zu erkennen.

Nach Koffeinbehandlung wurden, zumindest bei 200 rad, deutlich erhöhte RB'- und sub-RB'-Raten festgestellt, was zu CF-Werten von 1,54 (Fix. I), 2,9 (Fix. II), 2,74 (Fix. III) und 2,63 (Fix. IV) führt. Die gemittelten CF-Werte steigen mit zunehmender Fixierungszeit von $1,12 \pm 0,22$ auf $2,34 \pm 0,48$ an.

Die gesonderte Aufstellung der Translokationsraten in Tabelle 5.3.2.4 zeigt, daß bezüglich der sub-RB'-Raten zwischen koffeinierten und unbehandelten Kulturen kein wesentlicher Unterschied auftritt, wohingegen die RB'-Raten nach Koffeinbehandlung deutlich über denen unbehandelter Zellen liegen. Dies manifestiert sich für die RB' in mittleren CF-Werten, die selbst bei Verminderung um den Betrag ihres Fehlers ($|\pm \text{SE}|$) noch größer als 1 sind und mit zunehmender Fixierungszeit von $1,22 \pm 0,21$ auf $2,46 \pm 0,4$ ansteigen. Für die sub-RB'-Raten bewegen sich die CF-Werte mit $1,02 \pm 0,31$ (Fix. I), $1,09 \pm 0,29$ (Fix. II), $1,58 \pm 0,71$ (Fix. III) und 1 ± 0 (Fix. IV) um den "no effect level" (= 1).

Tabelle 5.3.2.3

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die dosisabhängigen Raten achromatischer Läsionen (AL), offener Chromatid- und Isochromatidbrüche (B' und B''), sowie chromatidaler und subchromatidaler Translokationen (RB' und sub-RB') nach Bestrahlung von Schimpansenlymphozyten in der G2-Phase des Zellzyklus

Fix.* Dosis (rad)	Anzahl Zellen +++	Aberrationen pro Zelle Koffeinfaktor (CF = $\frac{+}{-}$)													
		AL		B' + B''***		Mittelw. (+ SE)		CF		Mittelw. (+ SE)		RB' + sub-RB'****		Mittelw. (+ SE)	
		+	-	+	-							+	-		
I	0	100	100	0,07 / 0,04 = 1,75	0,03 / 0,01 = 3	1,27	1,54	1,11	1,04	0,2	0,2	0,2	0,2	1	1,12
	50	100	100	0,59 / 0,69 = 0,86	1,52 / 1,37 = 1,11	1,24 / 1,3 = 0,95	1,04	1,04	0,32 / 0,39 = 0,82	0,32 / 0,39 = 0,82	0,32 / 0,39 = 0,82	0,32 / 0,39 = 0,82	0,32 / 0,39 = 0,82	0,82	(0,22)
	100	100	100	1,24 / 1,3 = 0,95	3,18 / 3,05 = 1,04	5,25 / 3,5 = 1,5	7,49 / 7,45 = 1,01		0,97 / 0,63 = 1,54	0,97 / 0,63 = 1,54	0,97 / 0,63 = 1,54	0,97 / 0,63 = 1,54	0,97 / 0,63 = 1,54	1,54	
	200	102	56												
II	0	100	100	0,04 / 0,04 = 1	0,04 / 0,03 = 1,33	0,88	1,12	0,99	1,12	0,25 / 0,3 = 0,83	0,25 / 0,3 = 0,83	0,25 / 0,3 = 0,83	0,25 / 0,3 = 0,83	1,45	
	50	100	100	0,33 / 0,28 = 1,18	0,8 / 0,81 = 0,99	0,52 / 0,82 = 0,63	1,72 / 1,94 = 0,87	1,29	0,7 / 0,34 = 2,06	0,7 / 0,34 = 2,06	0,7 / 0,34 = 2,06	0,7 / 0,34 = 2,06	0,7 / 0,34 = 2,06	(0,64)	
	100	100	100	2,71 / 3,74 = 0,72	8,02 / 6,2 = 1,29				2,55 / 0,86 = 2,9	2,55 / 0,86 = 2,9	2,55 / 0,86 = 2,9	2,55 / 0,86 = 2,9	2,55 / 0,86 = 2,9		
	200	100	100												
III	0	100	100	0,06 / 0,04 = 1,5	0,06 / 0,03 = 2	1,22	1,32	1,18	1,32	0,2	0,13	0,2	0,13	1,54	1,67
	50	100	100	0,27 / 0,26 = 1,04	0,77 / 0,65 = 1,18	0,32 / 0,24 = 1,33	1,15 / 1,26 = 0,91	1,18	0,34 / 0,47 = 0,72	0,34 / 0,47 = 0,72	0,34 / 0,47 = 0,72	0,34 / 0,47 = 0,72	0,34 / 0,47 = 0,72	(0,59)	
	100	136	100	1,36 / 1,37 = 0,99	2,62 / 2,22 = 1,18				0,93 / 0,34 = 2,74	0,93 / 0,34 = 2,74	0,93 / 0,34 = 2,74	0,93 / 0,34 = 2,74	0,93 / 0,34 = 2,74		
	200	100	100												
IV	0	100	100	0,05 / 0,06 = 0,83	0,01 / 0,01 = 1	0,85	1,93	1,97	1,93	0,21 / 0,15 = 1,4	0,21 / 0,15 = 1,4	0,21 / 0,15 = 1,4	0,21 / 0,15 = 1,4	2,34	
	50	100	100	0,24 / 0,31 = 0,77	0,73 / 0,37 = 1,97	0,31 / 0,33 = 0,94	1,11 / 0,29 = 3,83	0,91	0,3 / 0,1 = 3	0,3 / 0,1 = 3	0,3 / 0,1 = 3	0,3 / 0,1 = 3	0,3 / 0,1 = 3	(0,48)	
	100	114	21	1,04 / 1,23 = 0,85	1,96 / 2,15 = 0,91				0,84 / 0,32 = 2,63	0,84 / 0,32 = 2,63	0,84 / 0,32 = 2,63	0,84 / 0,32 = 2,63	0,84 / 0,32 = 2,63		
	200	100	100												

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 1, 2, 4 und 6 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

*** Summe der offenen Chromatidbrüche (B'=1, B''=2)

**** Summe der an Translokationen beteiligten Brüche (RB' = reunited breaks)

SE = mittlerer Fehler
CF = caffeine factor
(1 = no effect level)

Tabelle 5.3.2.4

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die dosisabhängigen Raten chromatidaler (RB') und subchromatidaler Translokationen (sub-RB') nach Bestrahlung von Schimpansenlymphozyten in der G2-Phase des Zellzyklus und auf das Verhältnis beider Aberrationsformen zueinander

Fix.* Dosis (rad)	Anzahl Zellen +** -**	Aberrationen pro Zelle				Koffeineffekt (CF = $\frac{+}{-}$)		RB'	
		RB'*** +	RB'*** -	CF	Mittelw. (+ SE)	+	sub-RB'**** -	Mittelw. (+ SE)	Mittelw. (- SE)
I	50	100	100	0,16 / 0,12 = 1,33	1,22	0,04 / 0,08 = 0,5	1,02	4 / 1,5 = 2,67	3 / 3,65 = 0,83
	100	100	100	0,24 / 0,29 = 0,82	1,51	0,08 / 0,08 = 1	1,56	4 / 2,61 = 0,96	3 / 3,65 = 0,83
	200	102	56	0,71 / 0,47 = 1,51	2,26	0,28 / 0,18 = 1,56	1,09	2,5 / 2,18 = 3,44	3 / 3,65 = 0,83
II	50	100	100	0,19 / 0,2 = 0,95	2,26	0,06 / 0,1 = 0,6	1,09	3,17 / 2 = 1,59	3,18 / 2,4 = 1,33
	100	100	100	0,51 / 0,24 = 2,13	3,69	0,16 / 0,1 = 1,6	1,09	3,18 / 2,4 = 1,33	2,12
	200	100	100	2,25 / 0,61 = 3,69	1,78	0,30 / 0,28 = 1,07	1,58	7,5 / 2,18 = 3,44	7,5 / 2,18 = 3,44
III	50	100	100	0,16 / 0,09 = 1,78	1,73	0,04 / 0,04 = 1	1,58	4 / 2,25 = 1,78	2,78 / 2,92 = 0,95
	100	136	100	0,25 / 0,35 = 0,71	2,7	0,09 / 0,12 = 0,75	1,58	2,78 / 2,92 = 0,95	1,21
	200	100	100	0,81 / 0,3 = 2,7	2,46	0,12 / 0,04 = 3	1,58	6,75 / 7,5 = 0,9	6,75 / 7,5 = 0,9
IV	50	100	100	0,15 / 0,09 = 1,67	2,46	0,06 / 0,06 = 1	1,58	2,5 / 1,5 = 1,67	2,5 / 1,5 = 1,67
	100	114	21	0,27 / 0,1 = 2,7	1,73	0,04 / 0,04 = 1	1,58	6,75 / 7,5 = 0,9	6,75 / 7,5 = 0,9
	200	100	100	0,78 / 0,26 = 3	1,73	0,06 / 0,06 = 1	1,58	13 / 4,33 = 3	13 / 4,33 = 3

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 1, 2, 4 und 6 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

*** Summe der an Chromatidtranslokationen beteiligten Brüche;

**** Summe der an Subchromatidtranslokationen beteiligten Brüche

SE = mittlerer Fehler
CF = caffeine factor
(1 = no effect level)

Der Einfluß von Koffein auf die Reparatur während der G2-Phase ist in Tabelle 5.3.2.5 durch die Verhältnisse der Raten vereiniger Chromatidbrüche (RB', ohne sub-RB') zu den Raten offener Chromatidbrüche (B' und B'') dargestellt.

Die Tabelle zeigt, daß die Reunionsfaktoren für die Dosis von 200 rad, innerhalb des Fixierungszeitraums von der 1. bis zur 6. Stunde nach Koffeinbehandlung, von 0,09 auf 0,39 ansteigen. In unbehandelten Zellen (-) ist eine Zunahme der relativen Reparatur nur bei 100 rad festzustellen. Die für jede Fixierungszeit berechneten Mittelwerte ($\pm$ SE) nehmen von der ersten bis zur vierten Fixierung in behandelten Zellen (+) von $0,09 \pm 0,01$ auf $0,28 \pm 0,06$ und in nichtbehandelten Zellen von $0,08 \pm 0,01$ auf $0,23 \pm 0,06$ zu. Der größte Zuwachs der relativen Reparatur ist in beiden Fällen (+ und -) zwischen den Fixierungen I und II zu verzeichnen. Zwischen diesen beiden Fixierungen läßt sich außerdem ein Anstieg des Koffeineffekts (CF-Wertes) von $1,11 \pm 0,27$ auf $2,09 \pm 0,57$ erkennen. Es ist allerdings fraglich, ob dieser Wert in Bezug auf einen tatsächlichen Koffeineinfluß von Bedeutung ist, da sich diese Zunahme bei den übrigen CF-Werten nicht, wie zu erwarten wäre, fortsetzt. Diese Werte liegen bei $1,5 \pm 0,41$ (Fix. III) und $1,61 \pm 0,82$ und lassen aufgrund ihrer großen mittleren Fehler nicht auf eine Reparaturbeeinflussung durch Koffein schließen, zumal die Mittelwerte der Reunionsfaktoren auch nicht wesentlich voneinander abweichen.

In Tabelle 5.3.2.6 werden die Raten der radioaktiv markierten Zellen ohne und nach Koffeinbehandlung miteinander verglichen. Dabei sind für die Markierungsindizes (MI) ein Dosiseinfluß und eine Zeitabhängigkeit zu erkennen. Innerhalb einer Fixierung

Tabelle 5.3.2.5

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die relative Reparatur nach Bestrahlung von Schimpansenlymphozyten in der G2-Phase des Zellzyklus, ausgedrückt durch das Verhältnis der Raten vereinigt und offener Chromatidbrüche

Fix.*	Dosis (rad)	Anzahl Zellen +** -**	Aberrationen pro Zelle			relative Reparatur			$\frac{RB'}{B'}$
			RB'*** +	-	B'**** +	Mittelw. (+ SE)	-	Mittelw. (+ SE)	
I	50	100	0,16	0,12	1,52	1,37	0,11	0,09	1,22
	100	100	0,24	0,29	3,81	3,05	0,06	0,08	0,6
	200	102	0,71	0,47	7,49	7,45	0,09	0,06	1,11
II	50	100	0,19	0,2	0,8	0,81	0,24	0,25	0,96
	100	100	0,51	0,24	1,72	1,94	0,3	0,27	0,16
	200	100	2,25	0,61	8,02	6,2	0,28	0,02	2,5
III	50	100	0,16	0,09	0,77	0,65	0,21	0,14	1,5
	100	136	0,25	0,35	1,15	1,26	0,22	0,25	0,79
	200	100	0,81	0,3	2,62	2,22	0,31	0,03	2,21
IV	50	100	0,15	0,09	0,73	0,37	0,21	0,24	0,88
	100	114	0,27	0,1	1,11	0,29	0,24	0,28	0,71
	200	100	0,78	0,26	1,96	2,15	0,39	0,06	3,25

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 1, 2, 4 und 6 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

*** Summe der an Chromatidentranslokationen beteiligten Brüche

**** Summe der offenen Chromatidbrüche ($B^I=1$, $B^{II}=2$)

SE = mittlerer Fehler
CF = caffeine factor
(1 = no effect level)
 $\frac{RB'}{B'}$ = Reunionsfaktor

nehmen die MI mit steigender Dosis ab, und sie steigen für jede Dosis an, je später die Fixierung der Zellen erfolgte. In fast allen Fällen (außer Fix. IV, 0 rad) waren die Markierungsindizes nach Koffeinbehandlung erhöht. Für die sich daraus ergebenden CF-Werte ist zwischen der ersten und zweiten Fixierung ein deutlicher Anstieg der Mittelwerte ($\pm$ SE) von $1,8 \pm 0,67$ auf $2,96 \pm 0,58$ zu verzeichnen. Danach geht dieser Wert auf $1,49 \pm 0,08$ (Fix. III), beziehungsweise $1,16 \pm 0,08$ (Fix. IV) zurück.

Tabelle 5.3.2.6

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die Raten radioaktiv markierter Metaphasen (MI) von Schimpansenlymphozyten nach Bestrahlung in der G2-Phase (Es wurden jeweils 100 Zellen ausgewertet.)

Fix.*	Dosis (rad)	MI (% markierte Metaphasen)			CF = $\frac{+}{-}$	
		+++	---		CF	Mittelwerte ($\pm$ SE)
I	0	23	/ 21	=	1,1	1,8 (0,67)
	50	5	/ 2	=	2,5	
	100	3	/ 0			
	200	0	/ 0			
II	0	42	/ 25	=	1,68	2,96 (0,58)
	50	30	/ 10	=	3	
	100	24	/ 9	=	2,67	
	200	9	/ 2	=	4,5	
III	0	43	/ 30	=	1,43	1,49 (0,08)
	50	48	/ 28	=	1,71	
	100	32,5	/ 22	=	1,48	
	200	32	/ 24	=	1,33	
IV	0	54	/ 55	=	0,98	1,16 (0,08)
	50	49	/ 45	=	1,09	
	100	48	/ 35	=	1,37	
	200	42,5	/ 35	=	1,21	

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 1, 2, 4 und 6 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.
 ** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

SE = mittlerer Fehler
 CF = caffeine factor
 (1 = no effect level)
 MI = Markierungsindex

5.3.4 Schwein

Bei den Schweinelymphozyten erfolgte die Bestrahlung nach einer Kulturdauer von 41 Stunden (3.4, Versuchsplan C). Die erste Fixierung wurde eine halbe Stunde, die zweite eine Stunde, die dritte zwei und die vierte vier Stunden nach der Zugabe von tritiiertem Thymidin und Koffein durchgeführt. Dabei betrug die Dauer der Colchizinbehandlung (2.2) für die vierte Fixierung 2,5 Stunden; für die vorherigen Fixierungen entsprach sie der Inkubationszeit nach Bestrahlung und Behandlung der Zellen.

Auf den Präparaten der dritten Fixierung nicht-koffeinierter und mit 100 rad bestrahlter Kulturen waren keine auswertbaren Metaphasen zu beobachten. Die koffeinbehandelten Kulturen für die vierte Fixierung konnten wegen vollständiger Koagulation der Blutzellen (4.1c) leider nicht aufgearbeitet werden. Eine Wiederholung dieser Versuche ist nicht erfolgt.

Die Raten der geschädigten Zellen sind in Tabelle 5.3.3.1 angegeben. Die bei allen Fixierungen zu verzeichnende Dosisabhängigkeit ist in den Abbildungen 5.3.3.1a und b dargestellt. Der zeitliche Einfluß auf die induzierten Schädigungsraten ist aus den Abbildungen 5.3.3.2a und b ersichtlich.

Bei den beiden ersten Fixierungen steigen die Raten geschädigter Zellen in koffeinierter und in nicht-koffeinierter Kulturen in gleicher Weise an und erreichen Werte von 100 % (Fix. I) und 94,7 % beziehungsweise 94 % (Fix. II). In der dritten Fixierung sind von den mit 200 rad bestrahlten Lymphozyten nach Koffein-

Tabelle 5.3.3.1

Die dosisabhängigen Raten geschädigter Schweinelymphozyten nach Bestrahlung in der G2-Phase und gleichzeitiger Behandlung mit Koffein

Fix.*	Dosis (rad)	Anzahl Zellen				Anzahl Zellen % Zellen			
		insgesamt		normal		geschädigt***			
		+++	-**	+	-	+		-	
I	0	100	100	91	93	9	9	7	7
	50	65	120	20	30	47	69,2	90	75
	100	32	45	1	1	31	96,9	44	97,8
	200	18	23	0	0	18	100	23	100
II	0	100	100	93	94	7	7	6	6
	50	120	137	54	46	66	55	81	59,1
	100	74	73	8	8	66	89,2	65	89,0
	200	50	19	3	1	47	94	18	94,7
III	0	100	100	94	96	6	6	4	4
	50	101	100	68	64	33	32,7	36	36
	100	100		33		67	67		
	200	92	39	5	8	87	94,6	31	79,5
IV	0		100		95			5	5
	50		100		89			11	11
	100		100		75			25	25
	200		44		20			24	54,5

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 0,5, 1, 2 und 4 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

*** durch AL, B' und B'' und RB' und sub-RB'

behandlung 94,6 % geschädigt; ohne Koffeinbehandlung liegt die Schädigungsrate mit 79,5 % deutlich unter diesem Wert.

Für die vierte Fixierung (ohne Koffeinbehandlung) beträgt die maximale Rate geschädigter Zellen noch 54,5 %. In den Kontrollen (0 rad) treten in Gegenwart von Koffein zwischen 9 (Fix. I) und 6 % (Fix. III) und ohne Koffein zwischen 7 (Fix. I) und 4 % (Fix. III) geschädigter Lymphozyten auf. Aus diesen Raten läßt sich jedoch keine Zeitabhängigkeit ableiten.

Bei den Fixierungen I und II zeigen die Kurvenverläufe für die Raten geschädigter Zellen in koffeinierten (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.3.1a) und nicht-koffeinierten Kulturen (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.3.1b) einen starken Sättigungscharakter. Diese Eigenschaft ist bei den Kurven der dritten Fixierungen nur noch sehr schwach ausgeprägt. Bei der vierten Fixierung (Abb. 5.3.3.1b) nimmt die integrierte Exponentialfunktion die Form einer Geraden an.

Für die zeitliche Abhängigkeit läßt sich bei den mit 50 und 100 rad bestrahlten, nicht-koffeinierten Zellen eine Annäherung der Schädigungsraten an die Kontrollwerte erkennen (Abb. 5.3.3.2b), während die Raten nach Bestrahlung mit 200 rad eine deutlich andere Tendenz zeigen.

Abbildungen 5.3.3.1a und b

Die dosisabhängigen Raten geschädigter Schweinelymphozyten (PERCENT DAMAGED CELLS) 0,5 1, 2 und 4 Stunden (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung in der G₂-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.3.1a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.3.1b) Koffeinbehandlung, dargestellt durch die integrierte Exponentialfunktion:

$$Y = 1 - e^{-aD + bD^2}$$

Darin bedeuten:	Y	Raten geschädigter Zellen (PERCENT DAMAGED CELLS),
	D	Dosis (DOSE) und
a und b		Parameter der Funktion.

Abbildungen 5.3.3.2a und b

Die zeitabhängigen Raten geschädigter Schweinelymphozyten (PERCENT DAMAGED CELLS) (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung in der G₂-Phase mit 0, 50, 100 und 200 rad, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.3.2a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.3.2b) Koffeinbehandlung

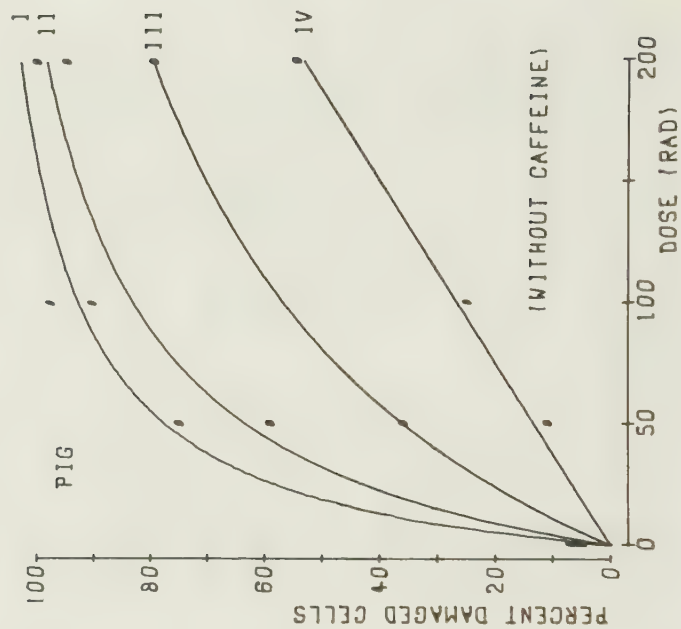


Abbildung 5.3.3.1b

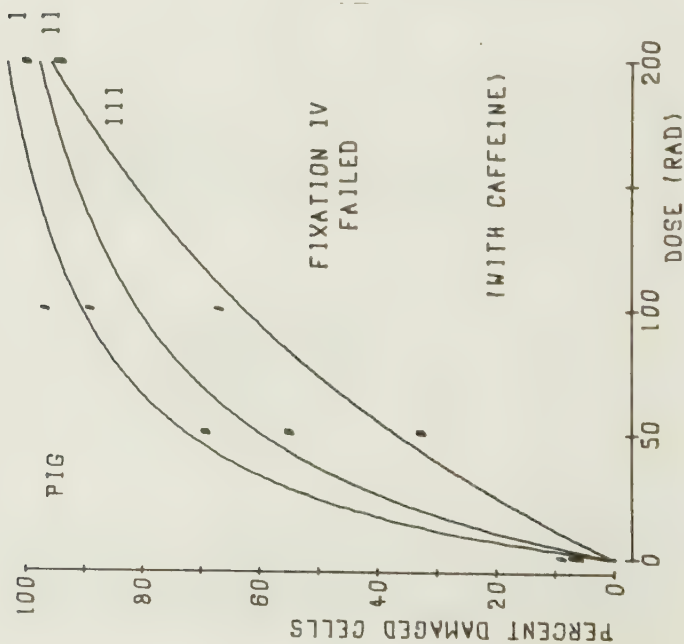


Abbildung 5.3.3.1a

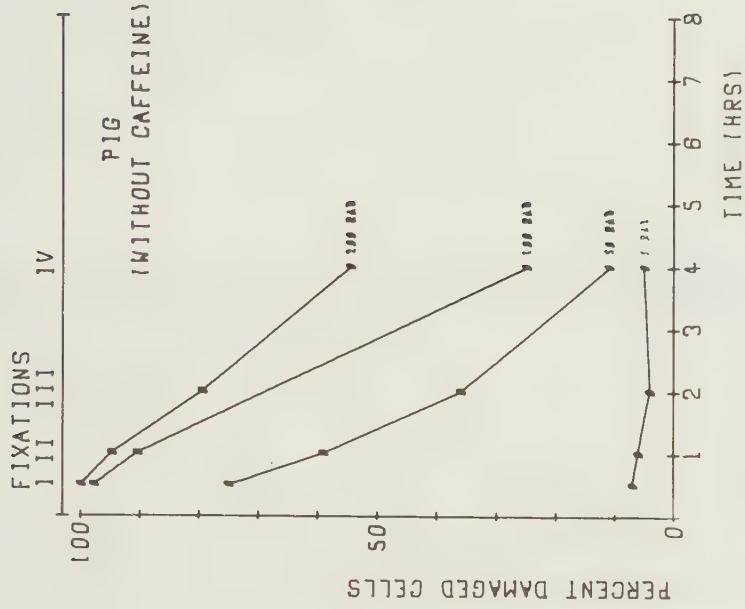


Abbildung 5.3.3.2b

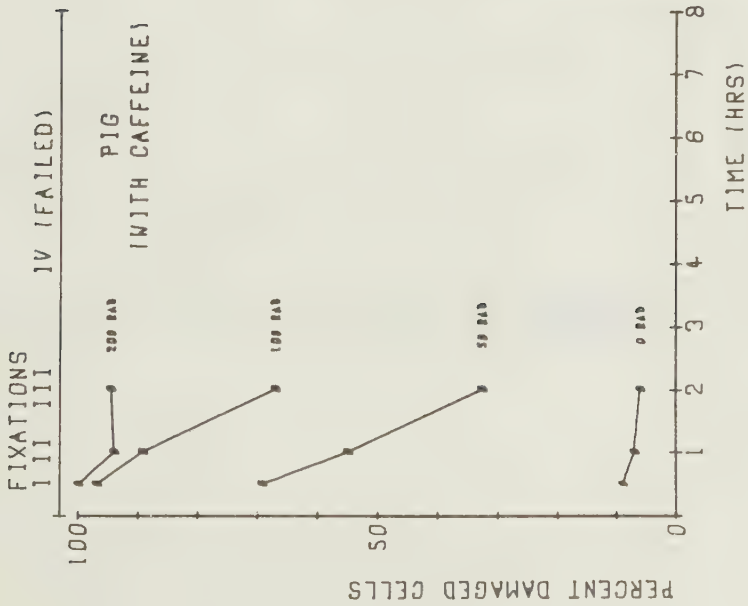


Abbildung 5.3.3.2a

Tabelle 5.3.3.2

Die dosisabhängigen Raten achromatischer Läsionen (AL), offener Chromatid-Translokationen (RB' und sub-RB') nach Bestrahlung von Schweinelymphozyten

Fix.*	Dosis (rad)	Anzahl Zellen		Anzahl Aberrationen							
				AL				B' B''			
		+++	-**	+		-		+		-	
I	0	100	100	7	0,07	6	0,06	2	0	1	0
	50	65	120	49	0,75	85	0,71	71	0	125	0
	100	32	45	38	1,19	52	1,16	87	0	105	1
	200	18	23	49	2,72	68	2,96	81	0	130	3
II	0	100	100	7	0,07	4	0,04	3	0	1	1
	50	120	137	57	0,48	61	0,45	106	0	111	0
	100	74	73	66	0,89	52	0,71	161	0	144	1
	200	50	19	108	2,16	30	1,57	252	0	74	0
III	0	100	100	4	0,04	3	0,03	0	2	1	0
	50	101	100	8	0,08	10	0,1	30	2	35	0
	100	100		32	0,32			116	2		
	200	92	39	260	2,83	84	2,15	443	5	103	0
IV	0		100			3	0,03			2	0
	50		100			2	0,02			9	0
	100		100			4	0,04			21	1
	200		44			7	0,16			31	0

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 0,5, 1, 2 und 4 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

und Isochromatidbrüche (B' und B''), sowie Chromatid- und Subchromatid- in der G2-Phase des Zellzyklus und gleichzeitiger Behandlung mit Koffein

Aberrationen pro Zelle

B' + B'' ***				RB' sub-RB'				RB' + sub-RB' ****			
+		-		+		-		+		-	
2	0,02	1	0,01	2	0			2	0,02		
71	1,09	125	1,04	0	8	2	4	8	0,12	6	0,05
87	2,72	107	2,38	4	6	2	14	10	0,31	16	0,36
81	4,5	136	5,91	2	14	0	4	16	0,89	4	0,17
3	0,03	3	0,03								
106	0,88	111	0,81	6	18	12	4	24	0,2	16	0,12
161	2,18	146	2	15	28	6	18	43	0,58	24	0,33
252	5,04	74	3,89	12	10	4	4	22	0,44	8	0,42
4	0,04	1	0,01								
34	0,34	35	0,35	8	0	15	0	8	0,08	15	0,15
120	1,2			62	4			66	0,66		
453	4,92	103	2,64	106	10	42	12	116	1,26	54	1,38
		2	0,02								
		9	0,09			2	0			2	0,02
		23	0,23			22	0			22	0,22
		31	0,7			84	0			37	0,84

*** Summe der offenen Chromatidbrüche (B'= 1, B''= 2)
 **** Summe der an Translokationen beteiligten Brüche
 (RB' = reunited breaks)

In Tabelle 5.3.3.2 sind die jeweilige Anzahl, sowie die Raten (pro Zelle) der ausgewerteten Aberrationen verzeichnet.

Mit steigender Dosis ist im allgemeinen auch ein Anstieg der Aberrationsraten zu erkennen. Ausnahmen bilden hierbei die Translokationsraten, die nach Bestrahlung mit 200 rad in nicht-koffeinierten Kulturen der ersten Fixierung und in koffeinierten Kulturen der zweiten Fixierung niedriger sind, als in Kulturen, die nur mit 100 rad bestrahlt worden waren. Dieser Sachverhalt beruht wahrscheinlich auf der bei dieser Dosis relativ kleinen Anzahl auswertbarer Zellen und ist somit nicht von besonderer Bedeutung.

Die Aberrationen, die in den Kontrollen zu beobachten waren, ergeben stets etwa gleiche Raten, unabhängig davon ob die Kulturen mit Koffein behandelt waren oder nicht. Eine zeitliche Abhängigkeit besteht daher nicht.

Die strahleninduzierten Aberrationsraten sinken, je später die Kulturen aufgearbeitet wurden. Ihre größte Abnahme ist zwischen der zweiten (Fix. III) und vierten Stunde (Fix. IV) nach Bestrahlung und radioaktiver Markierung nicht-koffeinierten Zellen zu verzeichnen. Achromatische Läsionen (AL) gehen innerhalb dieses Zeitraums von 2,15 auf 0,16 pro Zelle zurück, offene Brüche ($B' + B''$) nehmen von 2,64 auf 0,7 pro Zelle ab, und die Translokationsrate ($RB' + \text{sub-}RB'$) sinkt von ihrem, mit 1,38 höchsten Wert, auf 0,84 ab.

Für koffeinierte Lymphozyten ist eine zeitlich Abhängigkeit der AL-Raten nur für die Dosen 50 und 100 rad festzustellen. Nach Bestrahlung mit 200 rad treten in der ersten Fixierung 2,72 AL pro Zelle, in der zweiten Fixierung 2,16 und in der dritten Fixierung 2,83 AL pro Zelle auf.

Ähnliches gilt auch für die Bruchraten ($B' + B''$), die mit 4,5 (Fix. I), 5,04 (Fix. II) und 4,92 (Fix. III) pro Zelle, nach Koffeinbehandlung und Bestrahlung mit 200 rad, etwa gleiche Werte annehmen. Für die Tranlokationsrate ($RB' + \text{sub-}RB'$) in koffeinbehandelten Zellen ist nach 200 rad, zwischen der ersten und dritten Fixierung ein Anstieg auf 1,26 erfolgt.

Die jeweiligen Aberrationsraten aus Tabelle 5.3.3.2 sind in den Abbildungen 5.3.3.3a und b (AL), 5.3.3.4a und b ($B' + B''$) und 5.3.3.5a und b ($RB' + \text{sub-}RB'$) als Zeit-Effekt-Beziehungen dargestellt.

In den Abbildungen 5.3.3.3a und b ist zu erkennen, daß die AL-Raten für die Dosen 50 und 100 rad relativ gleichförmig abnehmen und in nicht-koffeinierten Kulturen nach 4 Stunden (Abb. 5.3.3.3b) auf das Niveau der Kontrollen absinken. Bei 200 rad ist bis zur dritten Fixierung eine starke Schwankung der Raten zu beobachten; bei der vierten Fixierung nähert sich die AL-Rate denen der übrigen Dosen. In den Fixierungen II und III liegen die AL-Raten nach Koffeinbehandlung deutlich über denen nicht-koffeinierten Zellen (vergl. Abb. 5.3.3.3a und -b).

Die Raten offener Chromatidbrüche ($B' + B''$) nehmen in Kulturen ohne Koffeinbehandlung bei allen Dosen gleichförmig ab und sinken auf Werte nahe den Kontrollraten (Abb. 5.3.3.4b). Für koffeinierte Zellen kann diese Feststellung aufgrund des Fehlens der vierten Fixierung nur für die Dosen 50 und 100 rad getroffen werden.

Für die Translokationsraten ($RB' + \text{sub-}RB'$) läßt sich lediglich bei nicht-koffeinierten Zellen ein, wie bei Mensch und Schim-

panse (Abb. 5.3.1.5a und b; Abb. 5.3.2.5a und b), nach Bestrahlung mit 200 rad beobachteter Kurvenverlauf feststellen (Abb. 5.3.3.5b).

Für die Tatsache, daß bei den übrigen Dosen, sowie im gesamten Koffeinversuch entsprechende Parallelen nicht klar zu erkennen sind, können als Ursachen zum einen, die relativ geringen Zahlen auswertbarer Zellen in den frühen Fixierungen und zum anderen, das Fehlen der Fixierung IV (Abb. 5.3.3.5a) angesehen werden.

Abbildungen 5.3.3.3a und b

Die Raten achromatischer Läsionen (ACHROMATIC LESIONS / CELL) in Metaphasen von Schweinelymphozyten, in Abhängigkeit von der Fixierungszeit (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung mit 0, 50, 100 und 200 rad in der G₂-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.3.3a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.3.3b) Koffeinbehandlung (AL-Werte aus Tabelle 5.3.3.2)

Abbildungen 5.3.3.4a und b

Die Raten offener Chromatidbrüche (OPEN BREAKS / CELL) in den Metaphasen von Schweinelymphozyten, in Abhängigkeit von der Fixierungszeit (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung mit 0, 50, 100 und 200 rad in der G₂-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.3.4a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.3.4b) Koffeinbehandlung (Werte (B' + B'') aus Tabelle 5.3.3.2)

Abbildungen 5.3.3.5a und b

Die Translokationsraten (REUNITED BREAKS / CELL) in den Metaphasen von Schweinelymphozyten, in Abhängigkeit von der Fixierungszeit (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung mit 0, 50, 100 und 200 rad in der G₂-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.3.5a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.3.5b) Koffeinbehandlung (Werte (RB' + sub-RB') aus Tabelle 5.3.3.2)

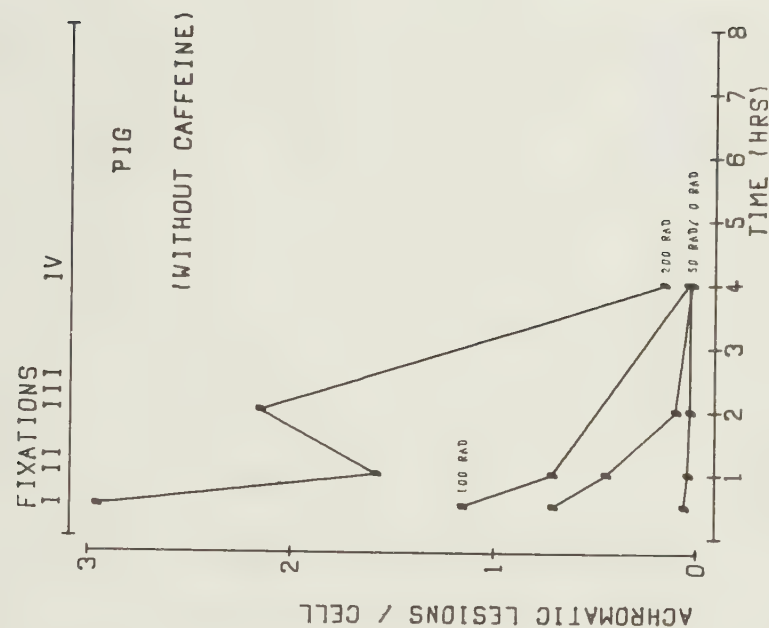


Abbildung 5.3.3.3b

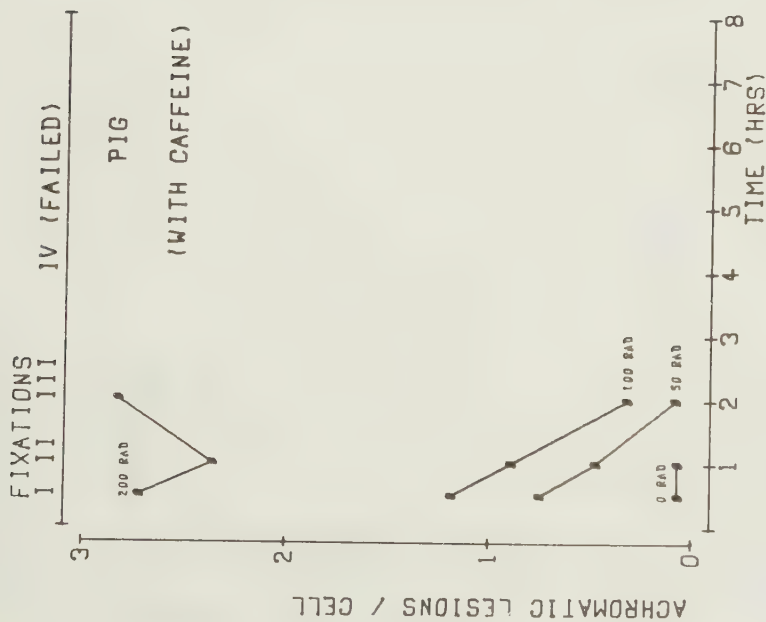


Abbildung 5.3.3.3a

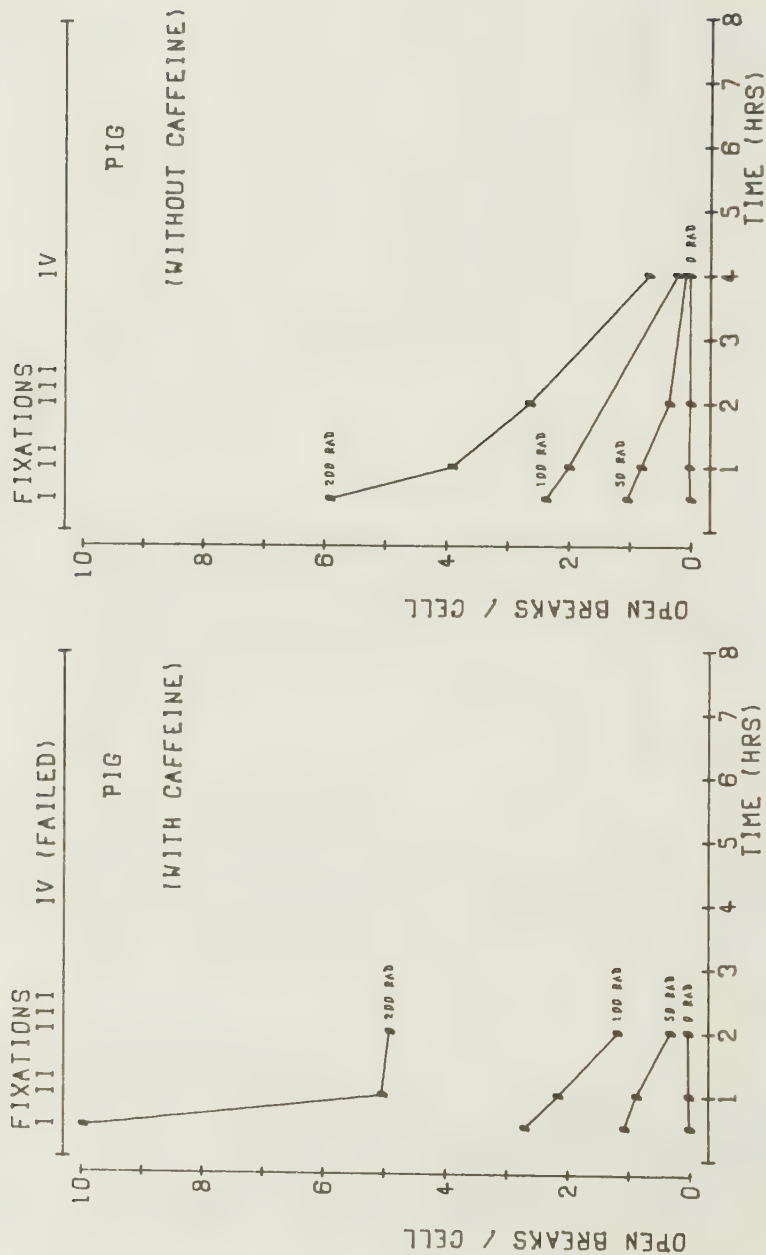


Abbildung 5.3.3.4b

Abbildung 5.3.3.4a

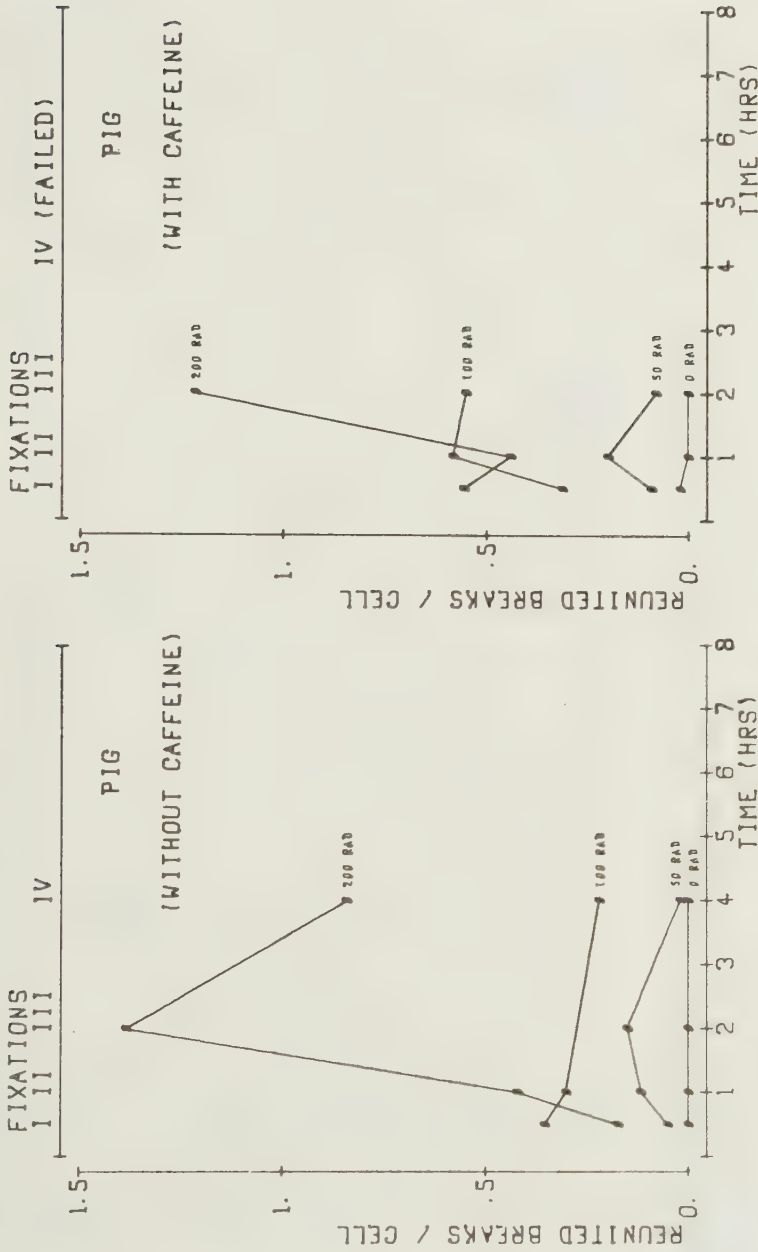


Abbildung 5.3.3.5b

Abbildung 5.3.3.5a

Tabelle 5.3.3.3

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die dosisabhängigen Raten achromatischer Läsionen (AL), offener Chromatid- und Isochromatidbrüche (B' und B''), sowie chromatidaler und subchromatidaler Translokationen (RB' und sub-RB') nach Bestrahlung von Schweinelymphozyten in der G2-Phase des Zellzyklus

Fix.* Dosis (rad)		Aberrationen pro Zelle Koffeinfaktor (CF = $\frac{+}{-}$)									
		+	AL	CF	Mittelw. (± SE)	+. B' + B''	CF	Mittelw. (± SE)	RB' + sub-RB'	+	Mittelw. (± SE)
I	0	100	0,07 / 0,06	1,17	0,02 / 0,01	2		0,02	0,12 / 0,05	2,4	2,83
	50	65	0,75 / 0,71	1,06	1,09 / 1,04	1,05		1,24	0,31 / 0,36	0,86	(1,28)
	100	32	1,19 / 1,16	1,02	2,72 / 2,38	1,14		(0,27)	0,89 / 0,17	5,24	
	200	18	2,72 / 2,96	0,92	4,5 / 5,91	0,76					
		23									
II	0	100	0,07 / 0,04	1,75	0,03 / 0,03	1		1,12	0,2 / 0,12	1,67	1,49
	50	120	0,48 / 0,45	1,07	0,88 / 0,81	1,09		(0,06)	0,58 / 0,33	1,76	(0,22)
	100	74	0,89 / 0,71	1,25	2,18 / 2	1,09			0,44 / 0,42	1,05	
	200	50	2,16 / 1,57	1,38	5,04 / 3,89	1,3					
		19									
III	0	100	0,04 / 0,03	1,33	0,04 / 0,01	4		2,28	0,08 / 0,15	0,53	0,72
	50	101	0,08 / 0,1	0,8	1,15 / 0,34	0,35		(0,9)	0,66		(0,19)
	100	100	0,32		1,2				1,26 / 1,38	0,91	
	200	92	2,83 / 2,15	1,32	4,92 / 2,64	1,86					
		39									
IV	0	100	0,03		0,02						
	50	100	0,02		0,09				0,02		
	100	100	0,04		0,23				0,22		
	200	44	0,16		0,7				0,84		

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 0,5, 1, 2 und 4 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.
 ** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein
 *** Summe der offenen Chromatidbrüche (B'=1, B''=2)
 **** Summe der an Translokationen beteiligten Brüche (RB' = reunited breaks)

SE = mittlerer Fehler
 CF = caffeine factor
 (1 = no effect level)

In Tabelle 5.3.3.3 sind die, für die einzelnen Aberrationsraten errechneten Koffeinfaktoren (CF-Werte), sowie deren Mittelwerte ($\pm$ SE) angegeben.

Auf die Raten achromatischer Läsionen ist kein Koffeineinfluß ersichtlich. Die gemittelten CF-Werte unterscheiden sich mit $1,04 \pm 0,05$ (Fix. I), $1,36 \pm 0,14$ (Fix. II) und $1,15 \pm 0,18$ nur unwesentlich vom "no effect level" (= 1).

Für die Bruchraten ($B' + B''$) wurde nach der dritten Fixierung ein CF-Wert von $2,28 \pm 0,9$ ermittelt. Angesichts des extremen Verhältnisses der Bruchraten in den Lymphozyten der Kontrollen (mit / ohne Koffein = 4), das auf vier, beziehungsweise einem Bruchereignis beruht, sowie in Ermangelung eines CF-Wertes für 100 rad, läßt sich aus dem erhöhten Mittelwert kein deutlicher Koffeineffekt ableiten. Lediglich die CF-Werte für 200 rad sind mit $0,76$ (Fix. I), $1,3$ (Fix. II) und $1,86$ (Fix. III), meiner Ansicht nach von Bedeutung und weisen auf einen Koffeineinfluß hin. Ihrer Berechnung liegen relativ große Zahlen von Bruchereignissen (siehe Tabelle 5.3.3.2) zugrunde. Dieser Sachverhalt trifft ebenfalls für die Dosis von 100 rad zu, jedoch weichen die beiden einzigen CF-Werte mit $1,14$ (Fix. I) und $1,09$ (Fix. II) nur geringfügig vom "no effect level" ab.

Die mittleren Koffeinfaktoren für die Translokationsraten ($RB' + \text{sub-}RB'$) sinken zwischen der ersten und dritten Fixierung von $2,83 \pm 1,28$ auf $0,72 \pm 0,19$ ab. Dieser, mit zunehmender Dauer der Koffeinbehandlung geringer werdende Einfluß steht im Widerspruch zu den bei Mensch und Schimpanse erhobenen Befunden (vergl. Tabellen 5.3.1.3 und 5.3.2.3).

Tabelle 5.3.3.4

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die dosisabhängigen Raten chromatider (RB') und subchromatider Translokationen (sub-RB') nach Bestrahlung von Schweinelymphozyten in der G2-Phase des Zellzyklus und auf das Verhältnis beider Aberrationsformen zueinander

Fix.* Dosis (rad)	Anzahl Zellen +** -**	Aberrationen pro Zelle				Koffeineffekt (CF = $\frac{+}{-}$)				RB' sub-RB'	
		+	-	RB'***	CF	Mittelw. ($\pm$ SE)	+	-	sub-RB'****	Mittelw. ($\pm$ SE)	Mittelw. ($\pm$ SE)
I	50	65	120	0	/ 0,02 = 0	1,63	0,12 / 0,03 = 4	0	0,67	0,27	0,13
	100	32	45	0,13 / 0,04 = 3,25		(1,63)	0,19 / 0,31 = 0,61	0,68	0,13	(0,21)	0,27
	200	18	23	0,11 0			0,78 / 0,17 = 4,59	0,14	0	(0,21)	(0,21)
II	50	120	137	0,05 / 0,09 = 0,56		1,4	0,15 / 0,04 = 3,75	0,33	2,25	0,69	0,32
	100	74	73	0,20 / 0,08 = 2,5		(0,57)	0,38 / 0,25 = 1,52	0,53	1,19	(0,26)	1
	200	50	19	0,24 / 0,21 = 1,14			0,2 / 0,21 = 0,95	1,2	(0,57)		
III	50	101	100	0,08 / 0,15 = 0,53		0,8	0	0	15,5	12,98	3,48
	100	100		0,62		(0,26)	0,04	0,35	10,45	(2,23)	
	200	92	39	1,15 / 1,08 = 1,06			0,11 / 0,31 = 0,35				
IV	50			0,02							
	100			0,22							
	200		44	0,84							

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 0,5, 1, 2 und 4 Stunden

nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

*** Summe der an Chromatidentranslokationen beteiligten Brüche;

**** Summe der an Subchromatidentranslokationen beteiligten Brüche

SE = mittlerer Fehler

CF = caffeine factor

(1 = no effect level)

In Tabelle 5.3.3.4 erfolgt die gesonderte Aufstellung der für RB' und für sub-RB' gefundenen Raten, und der je Dosis errechneten, sowie je Fixierung gemittelten ($\pm$ SE) Koffeinfaktoren. Für die Raten beider Aberrationsformen ist zumindest zwischen den Dosen 50 und 200 rad, in allen Fixierungen eine Erhöhung zu verzeichnen. Die RB'-Raten steigen je Dosis bis zur dritten Fixierung bei koffeinierten und nicht-koffeinierten Zellen an, wohingegen die Raten der sub-RB' diesbezüglich keine generelle Abhängigkeit erkennen lassen. Für die dosisbezogenen CF-Werte ist kein allgemeiner Zusammenhang ersichtlich. Die Werte schwanken innerhalb extrem großer Fehlergrenzen um ihre Mittelwerte.

Der Einfluß, den Koffein auf die Reparatur während der G2-Phase hat, geht aus Tabelle 5.3.3.5 hervor. Die Reunionsfaktoren als Maß für die relative Reparatur können innerhalb der einzelnen Fixierungen als nahezu gleich angesehen werden. Nach Koffeinbehandlung steigen deren Mittelwerte ($\pm$ SE) zwischen der ersten und dritten Fixierung von $0,02 \pm 0,01$ auf $0,33 \pm 0,09$ an. Ohne Koffeinbehandlung ergeben sich mittlere Reunionsfaktoren von $0,01 \pm 0,01$ (Fix. I), $0,07 \pm 0,02$ (Fix. II), $0,42 \pm 0,01$ (Fix. III) und $0,79 \pm 0,29$ (Fix. IV), womit ebenfalls ein deutlicher Anstieg der relativen Reparatur mit zunehmender Fixierungszeit bestätigt wird. Die Verhältnisse der Reunionsfaktoren mit und ohne Koffeinbehandlung ergeben CF-Werte von $1,25 \pm 1,25$ (Fix. I), $1,27 \pm 0,51$ (Fix. II) und $0,56 \pm 0$ (Fix. III). Aus diesen Werten, berücksichtigt man deren mittleren Fehler, kann jedoch kein Koffeineffekt abgeleitet werden.

Tabelle 5.3.3.5

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die relative Reparatur nach Bestrahlung von Schweinelymphozyten in der G2-Phase des Zellzyklus, ausgedrückt durch das Verhältnis der Raten vereinigter und offener Chromatidbrüche

Fix.*	Dosis (rad)	Anzahl Zellen +++ --*	Aberrationen pro Zelle				relative Reparatur				Mittelw. (+ SE)	RB' B'	
			RB'*** +	-	B'**** +	-	Mittelw. (+ SE)	-	Mittelw. (+ SE)	CF			
I	50	65	120	0	0,02	1,09	1,04	0	0,02	/	0,02	=	0
	100	32	45	0,13	0,04	2,72	2,38	0,05	0,02	/	0,02	0,01	= 2,5
	200	18	23	0,11		4,5	5,91	0,02	(0,01)	0		(0,01)	(1,25)
II	50	120	137	0,05	0,09	0,88	0,81	0,06	/	0,11	/	=	0,55
	100	74	73	0,2	0,08	2,18	2	0,09	0,07	/	0,04	0,07	= 2,25
	200	50	19	0,24	0,21	5,04	3,89	0,05	(0,01)	/	0,05	(0,02)	= 1 (0,51)
III	50	101	100	0,08	0,15	0,34	0,35	0,24	/	0,43	/	=	0,56
	100	100		0,62		1,2		0,52	0,33	/	0,42	0,42	= 0,56
	200	92	39	1,15	1,08	4,92	2,64	0,23	(0,09)	/	0,41	(0,01)	= 0,56 (0)
IV	50	100		0,02			0,09				0,22		
	100	100		0,22			0,23				0,95		0,79
	200	100		0,84			0,7				1,2		(0,29)

*	Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 0,5, 1, 2 und 4 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.												
**	"++" = mit Koffein; "--" = ohne Koffein												
***	Summe der an Chromatidentranslokationen beteiligten Brüche												
****	Summe der offenen Chromatidbrüche (B'=1, B''=2)												
												RB' B' = Reunionsfaktor	
												SE = mittlerer Fehler	
												CF = caffeine factor	
												(1 = no effect level)	

Für den Nachweis eines Einflusses des Koffeins auf die Dauer der G2-Phase und damit möglicherweise auf die, der Zelle für die Reparatur verfügbare Zeit, sind in Tabelle 5.3.3.6 die für jede Fixierung und je Dosis ermittelten Raten markierter Metaphasen (MI = Markierungsindex) verzeichnet. Von den autoradiographierten Präparaten wurden dazu jeweils 100 Metaphasen hinsichtlich radioaktiver Markierung (2.4) ausgewertet.

Tabelle 5.3.3.6

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die Raten radioaktiv markierter Metaphasen (MI) in Schweinelymphozyten nach Bestrahlung in der G2-Phase (Es wurden jeweils 100 Zellen ausgewertet.)

Fix.*	Dosis (rad)	MI (% markierte Metaphasen)		CF	CF = $\frac{+}{-}$ Mittelwerte ($\pm$ SE)	
		***	-**			
I	0	7	/ 4	= 1,75		
	50	0	0			
	100	0	0			
	200	0	0			
II	0	14	/ 11	= 1,27		
	50	3	/ 1,5	= 2		1,64
	100	1	0			(0,36)
	200	0	0			
III	0	59	/ 54	= 1,09		
	50	43	/ 34	= 1,26		2,68
	100	30	/ 17	= 1,76		(1,32)
	200	16,5	/ 2,5	= 6,6		
IV	0		72			
	50		71			
	100		67			
	200		56			

- * Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 0,5, 1, 2 und 4 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung. SE = mittlerer Fehler
 ** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein CF = caffeine factor
 (1 = no effect level) MI = Markierungsindex

Dabei ergaben sich bereits nach einer halben Stunde (Fix. I) in den Kontrollen koffeiniertes und nicht-koffeiniertes Schweine-lymphozyten MI von 7 beziehungsweise 4 %. Nach einer Stunde (Fix. II) traten in unbestrahlten Kulturen mit 14 % und ohne Koffeinbehandlung 11 % markierte Metaphasen auf; nach zwei Stunden (Fix. III) waren 59 beziehungsweise 54 % der Zellen markiert. In der vierten Fixierung, nach vier Stunden betrug der Markierungsindex 72 %. In allen Fixierungen ist eine deutliche Abhängigkeit des MI von der Dosis festzustellen. Die Koffeinfaktoren liegen ausnahmslos über dem "no effect level" (=1) und es ergeben sich Mittelwerte von $1,64 \pm 0,36$ (Fix.II) und $2,68 \pm 1,32$ (Fix.III).

5.3.4 Kaninchen

Kaninchenlymphozyten (Spender Rc) wurden nach einer Kultivierung von 41 Stunden mit 0, 50, 100 und 200 rad bestrahlt. Die Kulturen wurden eine (Fix. I), zwei (Fix. II), drei (Fix. III) und fünf (Fix. IV) Stunden (3.4, Versuchsplan C) nach Bestrahlung aufgearbeitet.

Tabelle 5.3.4.1 enthält die Raten der Zellen, die durch achromatische Läsionen (AL), offene Brüche (B' und B'') und Translokationen (RB' und sub-RB') geschädigt waren. Die Dosen 100 und 200 rad der ersten Fixierung (I) und 200 rad der zweiten Fixierung (II) führten in koffeinierten und nicht-koffeinierten Kulturen zu einer Schädigungsrate von 100 %. In den Kulturen,

Tabelle 5.3.4.1

Die dosisabhängigen Raten geschädigter Kaninchenlymphozyten nach Bestrahlung in der G2-Phase und gleichzeitiger Behandlung mit Koffein

Fix.*	Dosis (rad)	Anzahl Zellen				Anzahl Zellen % Zellen			
		insgesamt		normal		geschädigt***			
		***	-**	+	-	+		-	
I	0	100	100	93	95	7	7	5	5
	50	88	100	8	21	80	90,9	79	79
	100	39	48	0	0	39	100	48	100
	200	67	25	0	0	67	100	25	100
II	0	100	100	91	95	9	9	5	5
	50	100	100	38	50	62	62	50	50
	100	71	92	12	19	59	83,1	73	79,3
	200	53	33	0	0	53	100	33	100
III	0		100		90			10	10
	50	93	100		65	35	37,6	35	35
	100	26	113	8	75	18	69,2	38	33,6
	200	62	7	11	2	51	82,3	5	71,4
IV	0	100	100	89	91	11	11	9	9
	50	57	57	34	40	23	40,4	17	29,8
	100	28	89	12	61	16	57,1	28	31,5
	200	36	47	13	28	23	63,9	19	40,4

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 1, 2, 3 und 5 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

*** durch AL, B'und B" und RB' und sub-RB'

die mit Koffein behandelt wurden, waren mehr Zellen geschädigt als in nicht-koffeinierten Kulturen.

Die in allen Fixierungen deutlichen Dosis-Effekt-Beziehungen sind in den Abbildungen 5.3.4.1a und b dargestellt. Der zeitliche Einfluß auf die je Dosis induzierten Raten geschädigter Zellen ist in den Abbildungen 5.3.3.2a und b wiedergegeben.

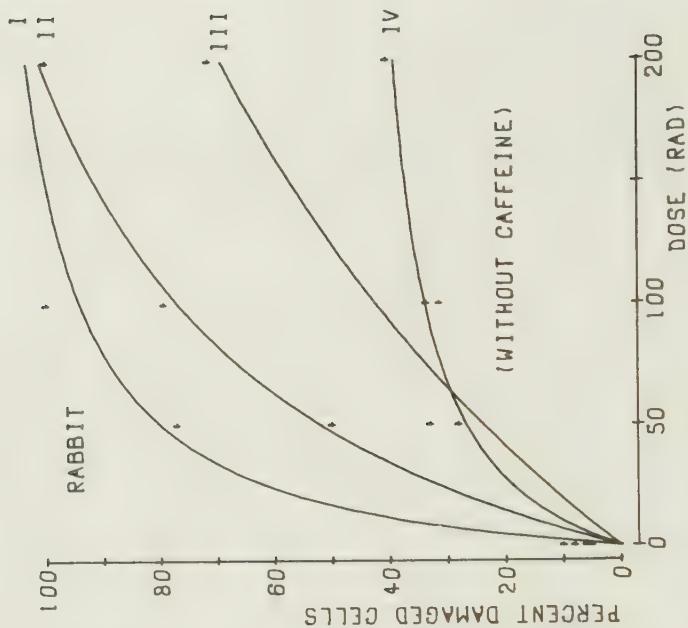


Abbildung 5.3.4.1b

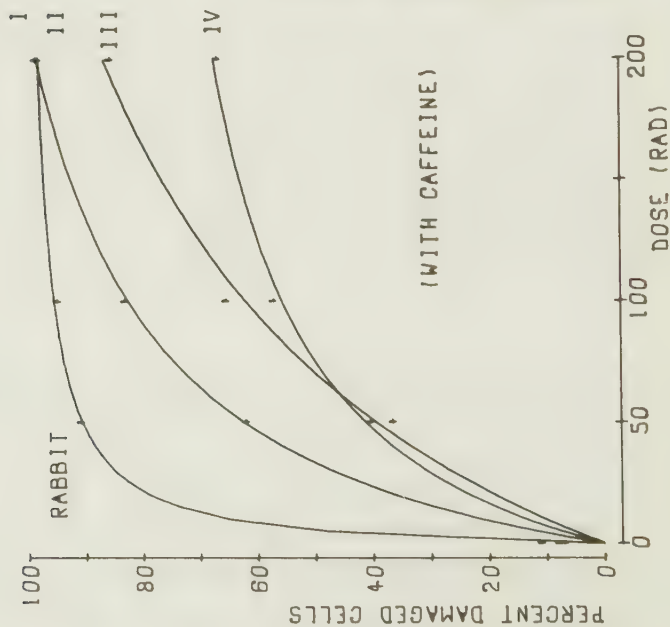


Abbildung 5.3.4.1a

Die Kurvenverläufe der Raten geschädigter Zellen zeigen für die einzelnen Fixierungen jeweils die gleichen Merkmale. Die Kurven unterscheiden sich dadurch, daß im unteren Dosisbereich für koffeinierte Zellen ein stärkerer Anstieg der Schädigungsraten zu beobachten ist (Abb. 5.3.4.1a) als für nicht-koffeinierte Zellen (Abb. 5.3.4.1b).

Mit zunehmender Fixierungszeit nehmen die dosisabhängigen Raten geschädigter Zellen ab (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.4.2b; WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.4.2a).

Abbildungen 5.3.4.1a und b

Die dosisabhängigen Raten geschädigter Kaninchenlymphozyten (PERCENT DAMAGED CELLS) 1, 2, 3 und 5 Stunden (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung in der G2-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.4.1a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.4.1b) Koffeinbehandlung, dargestellt durch die integrierte Exponentialfunktion:

$$Y = 1 - e^{-aD + bD^2}$$

Darin bedeuten:	Y	Raten geschädigter Zellen (PERCENT DAMAGED CELLS),
	D	Dosis (DOSE) und
a und b		Parameter der Funktion.

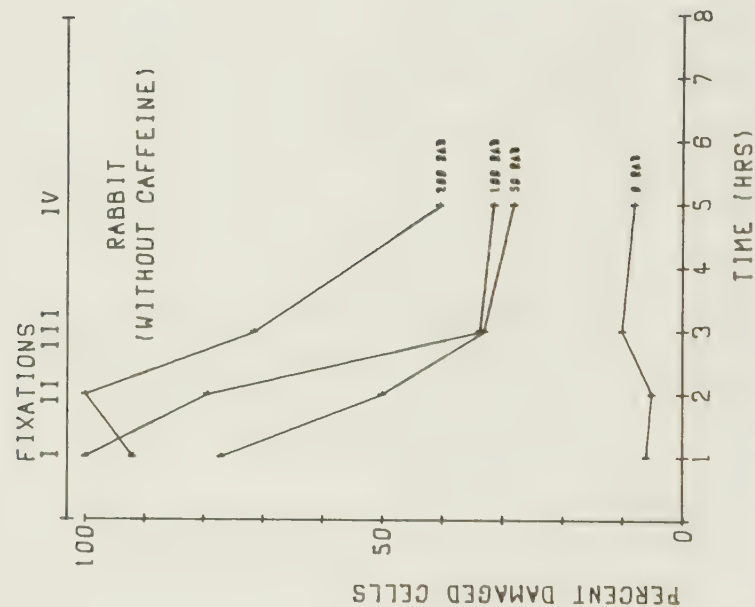


Abbildung 5.3.4.2b

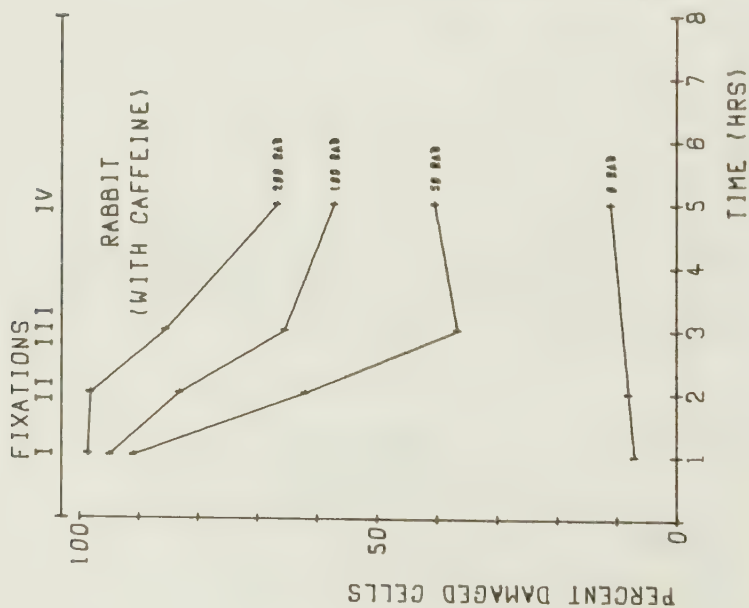


Abbildung 5.3.4.2a

Abbildungen 5.3.4.2a und b

Die zeitabhängigen Raten geschädigter Kaninchenlymphozyten (PERCENT DAMAGED CELLS) (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung in der G2-Phase mit 0, 50, 100 und 200 rad, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.4.2a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.4.2b) Koffeinbehandlung

Aus Tabelle 5.3.4.2 gehen die im einzelnen, je Dosis und Fixierung ausgewertete Anzahl chromatidaler Aberrationen, sowie die daraus ermittelten Raten hervor.

Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 5.3.4.3a und b (AL), 5.3.4.4a und b (B' + B'') und 5.3.4.5a und b (RB' + sub-RB') graphisch dargestellt.

Tabelle 5.3.4.2

Die dosisabhängigen Raten achromatischer Läsionen (AL), offener Chromatid-Translokationen (RB' und sub-RB') nach Bestrahlung von Kaninchenlymphozyten

Fix.*	Dosis (rad)	Anzahl Zellen		Anzahl Aberrationen							
				AL				B' B''			
				+ -		+ -		+ -		+ -	
I	0	100	100	5	0,05	3	0,03	2	0	2	0
	50	88	100	90	1,02	67	0,67	154	3	147	2
	100	39	48	70	1,79	84	1,75	184	4	174	1
	200	67	25	232	3,46	82	3,28	560	14	193	7
II	0	100	100	4	0,04	3	0,03	4	0	2	0
	50	100	100	46	0,46	37	0,37	75	3	58	1
	100	71	92	59	0,83	51	0,55	132	0	140	1
	200	53	33	123	2,32	113	3,42	366	7	254	1
III	0		100			7	0,07			4	0
	50	93	100	16	0,17	17	0,17	40	1	28	0
	100	26	113	12	0,46	17	0,16	29	1	44	0
	200	62	7	94	1,52	6	0,86	216	1	24	0
IV	0	100	100	8	0,08	5	0,05	4	0	3	0
	50	57	57	12	0,21	8	0,14	22	1	13	0
	100	28	89	9	0,32	10	0,11	17	0	17	0
	200	36	47	18	0,5	18	0,38	36	0	35	0

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 1, 2, 3 und 5 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

und Isochromatidbrüche (B' und B''), sowie Chromatid- und Subchromatid-
in der G2-Phase des Zellzyklus und gleichzeitiger Behandlung mit Koffein

| Aberrationen pro Zelle

B' + B'' ***		RB' sub-RB'				RB' + sub-RB' ****	
+	-	+	-	+	-	+	-
2 0,02	2 0,02	22	2	12	2	24 0,27	14 0,14
160 1,82	151 1,53	19	6	8	4	25 0,64	12 0,25
192 4,92	176 3,67	33	20	10	8	53 0,79	18 0,72
588 8,78	207 8,28						
4 0,04	2 0,02	2				2 0,02	
81 0,81	60 0,6	14	4	20	2	18 0,18	22 0,22
132 1,86	142 1,56	33	6	32	2	39 0,55	34 0,37
380 7,17	256 7,76	64	8	35	10	72 1,36	45 1,36
	4 0,04						
42 0,45	28 0,28	14	0	10	0	14 0,15	10 0,1
31 1,19	44 0,43	0	0	14	0	0 0	14 0,12
218 3,52	24 3,43	47	4	2	0	51 0,82	2 0,08
	4 0,04						
3 0,03	4 0,04						
24 0,42	13 0,23	6	0	8	0	6 0,11	8 0,14
17 0,61	17 0,19	11	2	22	0	13 0,46	22 0,25
36 1	35 0,74	16	4	10	0	20 0,56	10 0,21

*** Summe der offenen Chromatidbrüche (B'= 1, B''= 2)
**** Summe der an Translokationen beteiligten Brüche
(RB' = reunited breaks)

Abbildungen 5.3.4.3a und b

Die Raten achromatischer Läsionen (ACHROMATIC LESIONS / CELL) in Metaphasen von Kaninchenlymphozyten, in Abhängigkeit von der Fixierungszeit (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung mit 0, 50, 100 und 200 rad in der G₂-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.4.3a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.4.3b) Koffeinbehandlung (AL-Werte aus Tabelle 5.3.4.2)

Abbildungen 5.3.4.4a und b

Die Raten offener Chromatidbrüche (OPEN BREAKS / CELL) in den Metaphasen von Kaninchenlymphozyten, in Abhängigkeit von der Fixierungszeit (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung mit 0, 50, 100 und 200 rad in der G₂-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.4.4a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.4.4b) Koffeinbehandlung (Werte ($B' + B''$) aus Tabelle 5.3.4.2)

Abbildungen 5.3.4.5a und b

Die Translokationsraten (REUNITED BREAKS / CELL) in den Metaphasen von Kaninchenlymphozyten, in Abhängigkeit von der Fixierungszeit (FIXATIONS I, II, III und IV) nach Bestrahlung mit 0, 50, 100 und 200 rad in der G₂-Phase, mit (WITH CAFFEINE, Abb. 5.3.4.5a) und ohne (WITHOUT CAFFEINE, Abb. 5.3.4.5b) Koffeinbehandlung (Werte ($RB' + \text{sub-}RB'$) aus Tabelle 5.3.4.2)

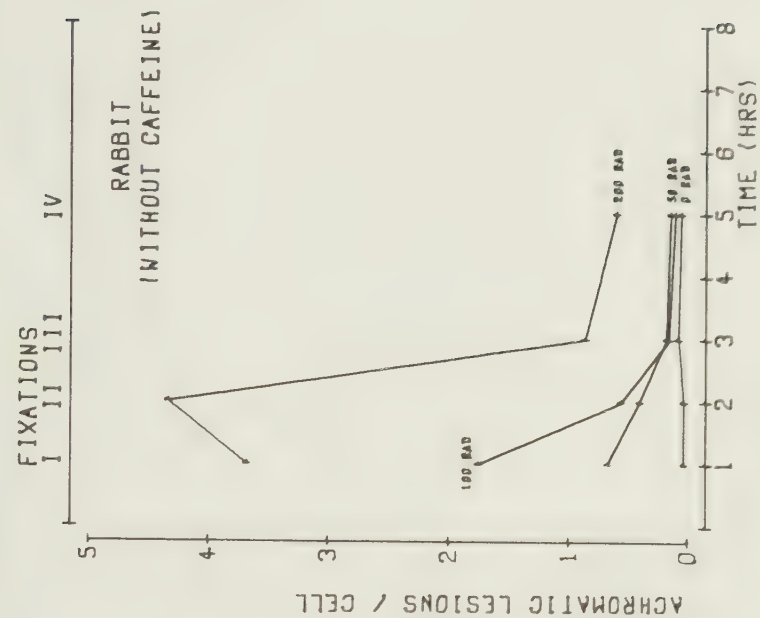


Abbildung 5.3.4.3b

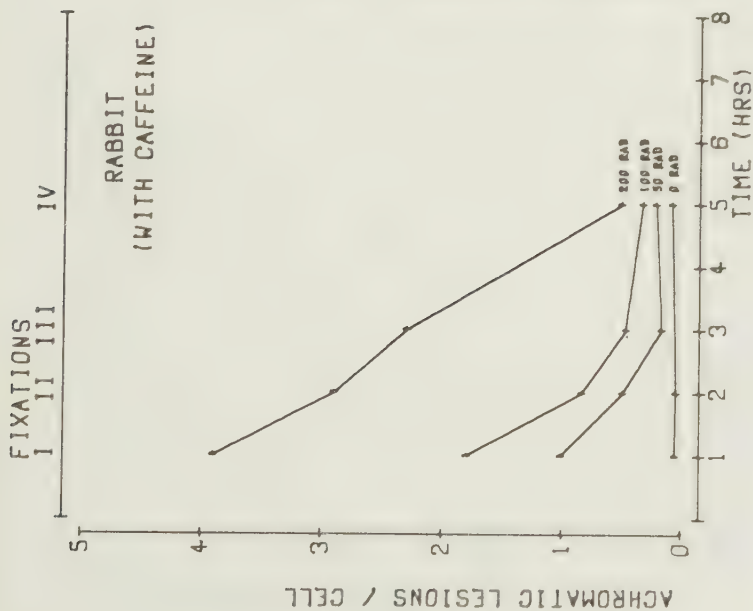


Abbildung 5.3.4.3a

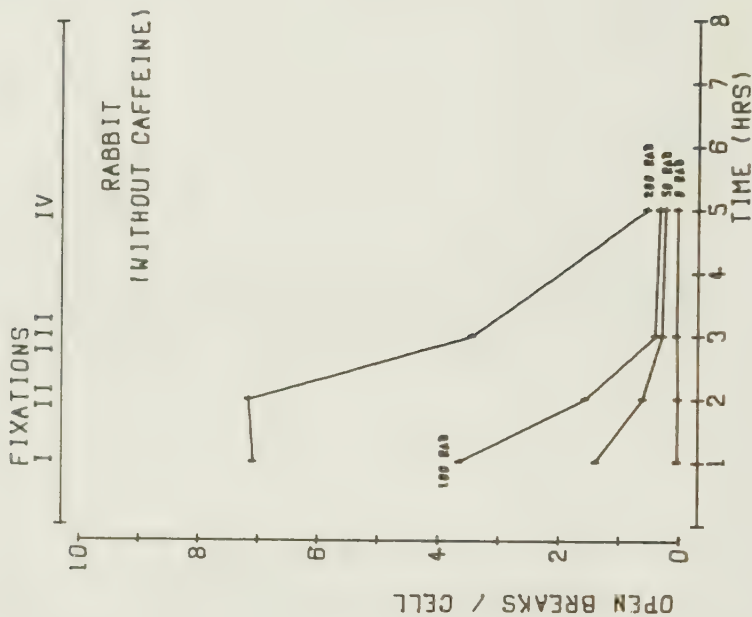


Abbildung 5.3.4.4b

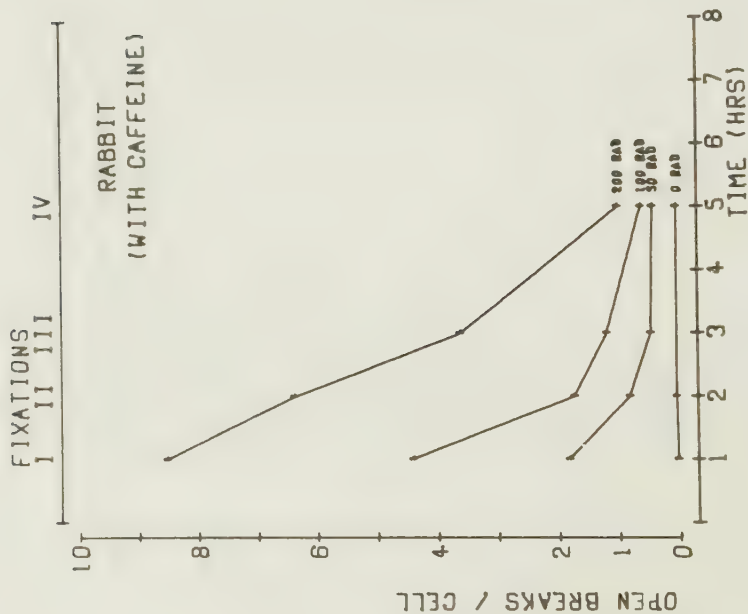


Abbildung 5.3.4.4a

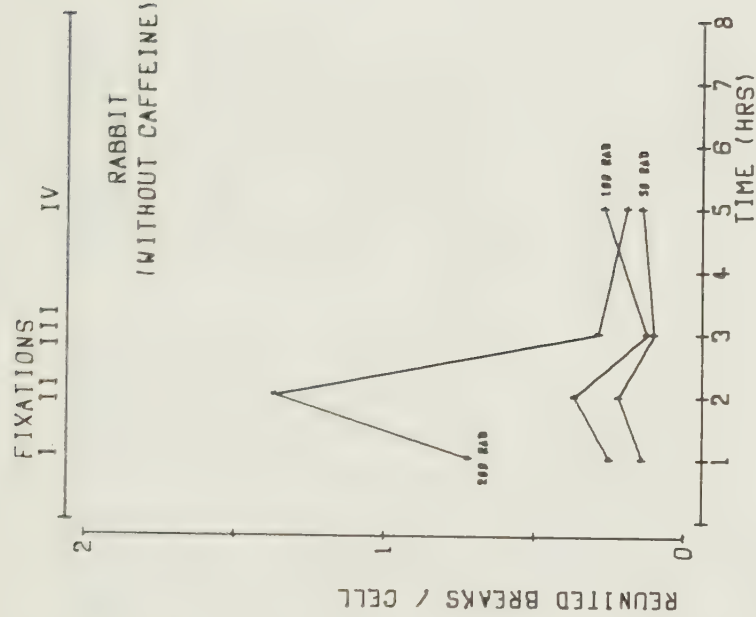


Abbildung 5.3.4.5b

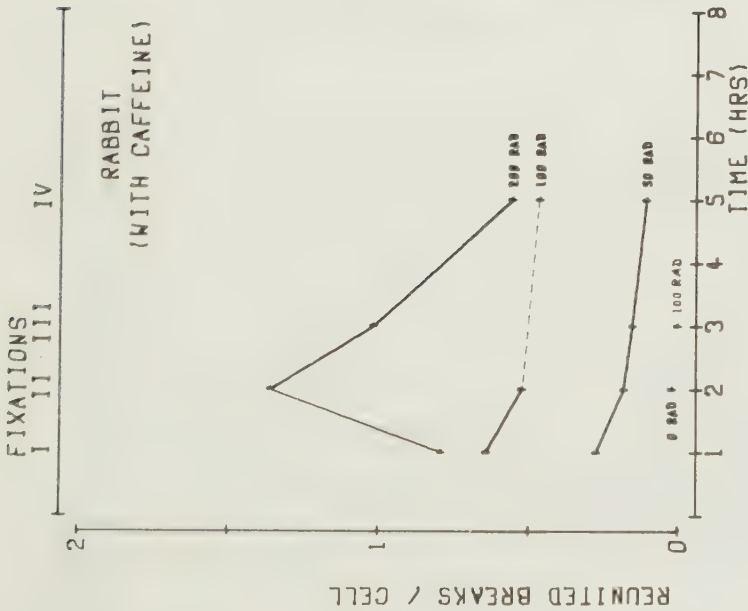


Abbildung 5.3.4.5a

Die Darstellungen zeigen, daß die AL- und Bruchraten in Kaninchenlymphozyten (Abb. 5.3.4.3a und b; Abb. 5.3.4.4a und b) mit steigender Fixierungszeit abnehmen. Für die Dosis von 200 rad ist in nicht-koffeinierten Zellen ein geringfügiger Anstieg der Raten beider Aberrationstypen zu beobachten (Abb. 5.3.4.3b und Abb. 5.3.4.4b).

In den Abbildungen 5.3.4.5a und b sind zwischen der ersten und zweiten Fixierung nach Bestrahlung mit 200 rad der bereits bei Mensch und Schimpanse eingetretene Anstieg und der anschließende Rückgang der Translokationsrate ($RB' + \text{sub-}RB'$) zu erkennen (vergl. Abb. 5.3.1.5a und b; Abb. 5.3.2.5a und b). In koffein-behandelten Zellen liegt diese Rate nach fünf Stunden (Fix. IV) noch deutlich über der nicht-koffeinierten Zellen, was ebenfalls für die mit 100 rad bestrahlten Zellen gilt.

In Tabelle 5.3.4.3 ist der Einfluß von Koffein auf die Raten der ausgewerteten Aberrationen in Form der einzelnen, dosisbezogenen Koffeinfaktoren (CF-Werte) dargestellt. Die daraus berechneten Mittelwerte ($\pm$ SE) liegen bei allen Fixierungen über dem "no effect level". Der mittlere CF-Wert für die Translokationsraten der dritten Fixierung (= 3,92) setzt sich aus extremen Einzelwerten zusammen, und ist daher mit einem überdurchschnittlich hohen mittleren Fehler von 3,2 (= 81,6 %) behaftet. Die Fehler der übrigen Werte schwanken zwischen 7 und 30 %; die relativen mittleren Fehler steigen mit zunehmender Fixierungszeit an.

Tabelle 5.3.4.3

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die dosisabhängigen Raten achromatischer Läsionen (AL), offener Chromatid- und Isochromatidbrüche (B' und B''), sowie chromatidaler und subchromatidaler Translokationen (RB' und sub-RB') nach Bestrahlung von Kaninchenlymphozyten in der G2-Phase des Zellzyklus

Fix.* Dosis (rad)	Anzahl Zellen +** -**	Aberrationen pro Zelle Koffeinfaktor ($CF = \frac{+}{-}$)									
		AL		B' + B''**		Mittelw. (+ SE)		CF		Mittelw. (+ SE)	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
I	0	100	100	0,05 / 0,03 = 1,67	0,02 / 0,02 = 1	1,67	1	0,02 / 0,14 = 1,93	0,27 / 0,14 = 1,93	1,86	1,86
	50	88	100	1,02 / 0,67 = 1,52	1,82 / 1,53 = 1,19	1,32	1,15	0,64 / 0,25 = 2,56	0,64 / 0,25 = 2,56	(0,43)	(0,43)
	100	39	48	1,79 / 1,75 = 1,02	4,92 / 3,67 = 1,34	(0,16)	(0,08)	0,79 / 0,72 = 1,09	0,79 / 0,72 = 1,09		
	200	67	25	3,46 / 3,28 = 1,05	8,78 / 8,28 = 1,06						
II	0	100	100	0,04 / 0,03 = 1,33	0,04 / 0,02 = 2	1,33	2	0,02	0,18 / 0,22 = 0,82	1,1	1,1
	50	100	100	0,46 / 0,37 = 1,24	0,81 / 0,6 = 1,35	1,19	1,37	0,55 / 0,37 = 1,49	0,55 / 0,37 = 1,49	(0,2)	(0,2)
	100	71	92	0,83 / 0,55 = 1,51	1,86 / 1,56 = 1,19	(0,18)	(0,23)	1,36 / 1,36 = 1	1,36 / 1,36 = 1		
	200	53	33	2,32 / 3,42 = 0,68	7,17 / 7,76 = 0,92						
III	0	100	100	0,07	0,04	1,88	1,8	0,15 / 0,1 = 1,5	0,15 / 0,1 = 1,5	3,92	3,92
	50	93	100	0,17 / 0,17 = 1	0,45 / 0,28 = 1,61	(0,55)	(0,51)	0 / 0,12 = 0	0 / 0,12 = 0	(3,2)	(3,2)
	100	26	113	0,46 / 0,16 = 2,88	1,19 / 0,43 = 2,77			0,82 / 0,08 = 10,25	0,82 / 0,08 = 10,25		
	200	62	7	1,52 / 0,86 = 1,77	3,52 / 3,43 = 1,03						
IV	0	100	100	0,08 / 0,05 = 1,6	0,03 / 0,04 = 0,75	1,83	1,79	0,11 / 0,14 = 0,79	0,11 / 0,14 = 0,79	1,77	1,77
	50	57	57	0,21 / 0,14 = 1,5	0,42 / 0,23 = 1,83	(0,36)	(0,52)	0,46 / 0,25 = 1,84	0,46 / 0,25 = 1,84	(0,54)	(0,54)
	100	28	89	0,32 / 0,11 = 2,91	0,61 / 0,19 = 3,21			0,56 / 0,21 = 2,67	0,56 / 0,21 = 2,67		
	200	36	47	0,5 / 0,38 = 1,32	1 / 0,74 = 1,35						

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 1, 2, 3 und 5 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

*** Summe der offenen Chromatidbrüche (B'=1, B''=2)

**** Summe der an Translokationen beteiligten Brüche (RB' = reunited breaks)

SE = mittlerer Fehler
CF = caffeine factor
(1 = no effect level)

Tabelle 5.3.4.4

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die dosisabhängigen Raten chromatider (RB') und subchromatider Translokationen (sub-RB') nach Bestrahlung von Kaninchenlymphozyten in der G2-Phase des Zellzyklus und auf das Verhältnis beider Aberrationsformen zueinander

Fix.* Dosis (rad)	Anzahl Zellen +*** -**	Aberrationen pro Zelle Koffeineffekt (CF = + -)						RB' sub-RB'	
		+	-	CF	Mittelw. (+ SE)	+	-	Mittelw. (+ SE)	Mittelw. (+ SE)
I	50	88	100	0,25 / 0,12 = 2,08	1	0,02 / 0,02 = 1	12,5	6	
	100	39	48	0,49 / 0,17 = 2,88	2,06	0,15 / 0,08 = 1,88	1,27	5,8	2,13
	200	67	75	0,49 / 0,4 = 1,23	(0,48)	0,3 / 0,32 = 0,94	(0,3)	1,63	(3,38)
								1,25	(1,46)
II	50	100	100	0,14 / 0,2 = 0,7	1	0,04 / 0,02 = 2	3,5	1	
	100	71	92	0,46 / 0,35 = 1,31	1,05	0,08 / 0,02 = 4	2,16	5,75	17,5
	200	53	33	1,21 / 1,06 = 1,14	(0,18)	0,15 / 0,3 = 0,5	(1,01)	8,07	(1,22)
								3,53	(5,13)
III	50	93	100	0,15 / 0,1 = 1,5	1	0			
	100	26	113	0 / 0,12 = 0	1,37	0			
	200	62	7	0,76 / 0,29 = 2,62	(0,76)	0,06	0	12,67	
IV	50	57	57	0,11 / 0,14 = 0,79	1	0			
	100	28	89	0,39 / 0,25 = 1,56	1,48	0,07	0	5,57	4,79
	200	36	47	0,44 / 0,21 = 2,1	(0,38)	0,11	0	4	(0,78)

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 1, 2, 3 und 5 Stunden nach Bestrahlung; radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

*** Summe der an Chromatidentranslokationen beteiligten Brüche;

**** Summe der an Subchromatidentranslokationen beteiligten Brüche

SE = mittlerer Fehler
CF = caffeine factor
(1 = no effect level)

In Tabelle 5.3.4.4 sind die Raten für Chromatid- und Subchromatidtranslokationen gesondert und mit ihren jeweiligen CF-Werten angegeben. Für die RB'-Raten sind die einzelnen CF-Werte zumeist größer als 1, was einen erhöhenden Koffeineinfluß auf die Raten chromatidaler Translokationen (RB'), als Folge der Reparatur von Chromatidbrüchen während der G2-Phase bedeutet. Für die Raten der Subchromatidtranslokationen (sub-RB') konnten CF-Werte nur für die Fixierungen I und II berechnet werden, da in den nicht-koffeinierten Kulturen der Fixierungen III und IV keine sub-RB' aufgetreten sind. Die mittleren CF-Werte betragen für diese Fixierungen $1,27 \pm 0,3$ beziehungsweise $2,16 \pm 1,01$. Ein Koffeineinfluß kann anhand dieser Werte weder belegt noch ausgeschlossen werden. Aufgrund der Tatsache, daß sub-RB' nur vereinzelt zu beobachten waren und nicht bei allen Fixierungen auftraten, ist den unterschiedlichen Verhältnisse der RB'- zu den sub-RB'-Raten keine besondere Bedeutung zuzumessen.

Die in Tabelle 5.3.4.5 angegebenen Reunionsfaktoren lassen eine Zunahme der relativen Reparatur mit steigender Fixierungszeit erkennen. Nach Behandlung mit Koffein erhöht sich der mittlere Reunionsfaktor von $0,1 \pm 0,02$ (Fix. I) auf $0,45 \pm 0,11$; in nicht-koffeinierten Kulturen steigt er von $0,06 \pm 0,01$ auf $0,74 \pm 0,31$. Aus den CF-Werten für die relative Reparatur läßt sich jedoch kein Koffeineffekt ableiten. Abgesehen vom mittleren CF-Wert für die erste Fixierung, der mit $1,59 \pm 0,23$ das größte Verhältnis der relativen Reparatur in Zellen mit und ohne Koffeinbehandlung darstellt, streuen die übrigen CF-Werte mit $0,96 \pm 0,22$ (Fix. II), $1,22 \pm 0,81$ (Fix. III) und $0,82 \pm 0,37$ (Fix. IV) um den "no effect level".

Tabelle 5.3.4.5

Der Einfluß von Koffein (KF) auf die relative Reparatur nach Bestrahlung von Kaninchenlymphozyten in der G₂-Phase der Zellzyklus, ausgedrückt durch das Verhältnis der Raten vereinigter und offener Chromatidbrüche

Fix.*	Dosis (rad)	Anzahl Zellen	Aberrationen pro Zelle			relative Reparatur			$\frac{RB^+}{B^+}$						
			RB*** +	B**** +	B**** -	Mittelw. (+ SE)	-	Mittelw. (+ SE)		CF					
I	50	88	100	0,25	0,12	1,82	1,53	0,14	/	0,09	/	0,05	0,06	= 2	1,56
	100	39	48	0,49	0,17	4,92	3,67	0,1	0,1	/	0,05	/	0,05	0,06	1,59
	200	67	25	0,49	0,4	8,78	8,78	0,06	0,06	/	0,05	/	0,05	0,06	1,2
II	50	100	100	0,14	0,2	0,81	0,6	0,17	/	0,33	/	0,33	0,23	=	0,52
	100	71	92	0,46	0,35	1,86	1,56	0,25	0,2	/	0,22	/	0,23	=	1,14
	200	53	33	1,21	1,06	7,17	7,76	0,17	0,17	/	0,14	/	0,06	=	1,21
III	50	93	100	0,15	0,1	0,45	0,28	0,33	/	0,36	/	0,36	0,24	=	0,92
	100	26	113	0	0,12	1,19	0,43	0	0,33	/	0,28	/	0,08	=	0
	200	62	7	0,76	0,29	3,52	3,43	0,22	0,22	/	0,08	/	0,08	=	2,75
IV	50	57	57	0,11	0,14	0,42	0,23	0,26	/	0,61	/	0,61	0,74	=	0,42
	100	28	39	0,39	0,25	0,61	0,19	0,64	0,45	/	0,45	/	0,45	=	0,45
	200	36	47	0,44	0,21	1	0,74	0,44	0,11	/	0,22	/	0,31	=	1,57
*	Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 1, 2, 3 und 5 Stunden														
*	nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.														
***	u _u = mit Koffein; u _{-u} = ohne Koffein														
****	Summe der an Chromatidentranslocationen beteiligten Brüche														
*****	Summe der offenen Chromatidbrüche (B ⁺ =1, B ^u =2)														
															SE = mittlerer Fehler
															CF = coefficient
															(1 = no effect level)
															RB ⁺ = Reunionsfaktor

Die Raten der nach Behandlung der Kulturen mit 5-³H-Thymidin markierten Metaphasen sind in Tabelle 5.3.4.6 dargestellt. Mit zunehmender Behandlungsdauer tritt eine Erhöhung dieser Raten ein, was auf ein Fortschreiten der G2-Phase hinweist. In allen Fixierungen ist mit und ohne Koffeinbehandlung ein ausgeprägter, die G2-Phase verzögernder Dosisinfluß festzustellen. Bis auf eine Ausnahme (Fix. I, 50 rad) waren in allen koffeinierten Kulturen jeweils höhere Markierungsindizes (MI) zu verzeichnen.

Tabelle 5.3.4.6

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die Raten radioaktiv markierter Metaphasen (MI) in Kaninchenlymphozyten nach Bestrahlung in der G2-Phase (Es wurden jeweils 100 Zellen ausgewertet.)

Fix.*	Dosis (rad)	MI (% markierte) (Metaphasen)		CF = $\frac{+}{-}$	
		+++	---	CF	Mittelwerte (+ SE)
I	0	11	7	= 1,57	
	50	4,4	5	= 0,89	
	100	0	0		
	200	0	0		
II	0	41	29	= 1,41	
	50	32,5	20	= 1,63	
	100	19,5	10	= 1,95	
	200	13	2,5	= 5,2	
III	0		51		
	50	44	37	= 1,19	
	100	34	32	= 1,06	
	200	24,5	13	= 1,85	
IV	0	77	64,5	= 1,19	
	50	64	48,5	= 1,32	
	100	50	40,5	= 1,23	
	200	37	26,5	= 1,4	

* Die Fixierungen I, II, III und IV erfolgten 1, 2, 3 und 5 Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung.

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

SE = mittlerer Fehler
CF = caffeine factor
(1 = no effect level)
MI = Markierungsindex

5.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse (C)

In den kultivierten Lymphozyten von Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen nehmen die Raten der ausgewerteten Aber-rationen nach Bestrahlung in der G2-Phase mit steigender Dosis zu. Die dosisabhängigen Raten achromatischer Läsionen (AL) und Brüche ($B' + B''$) nehmen ab, je später die betreffenden Kulturen fixiert wurden. Auf die AL- und Bruchraten und auf die Raten subchromatidaler Translokationen (sub-RB') ist, den Ergebnissen der Auswertung nach zu urteilen, kein Koffeineffekt erkennbar (siehe Tabellen 5.3.1.3 und -4, 5.3.2.3 und -4, 5.3.3.3 und -4 und 5.3.4.3 und -4). Mit und ohne Koffeinbehandlung treten je Bestrahlungsdosis und Fixierung stets etwa gleiche Raten auf. Nach Bestrahlung mit 200 rad steigen die Translokationsraten ($RB' + \text{sub-RB}'$) zunächst sehr steil an (vergl. Abbildungen 5.3.1.5a -b, 5.3.2.5a -b, 5.3.3.5a -b und 5.3.4.5a -b) und sinken in der vierten Fixierung unter die Werte der ersten Fixierung ab. In Lymphozytenkulturen von Mensch Schimpanse und Kaninchen sind die für die Fixierungen III und IV zu verzeichnenden Translokationsraten nach Koffeinbehandlung größer als in nicht-koffeinierten Kulturen. Dieser Sachverhalt ist in Tabelle 5.3.5.1 dargestellt. Für die Kulturen von Schweinelymphozyten läßt sich ein derartiger Sachverhalt nicht aufzeigen, weil in den mit 200 rad bestrahlten Kulturen nur relativ wenige Zellen ausgewertet werden konnten, und weil für die vierte Fixierung koffeinierten Kulturen, aus den bereits dargelegten Gründen (siehe 5.3.3), keine Auswertung möglich war.

Tabelle 5.3.5.1

Die zeitabhängigen Raten geschädigter Metaphasen und die Aberrationsraten in den Lymphozyten von Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen, zwei Stunden nach Bestrahlung mit 200 rad in der G2-Phase und gleichzeitiger Behandlung mit Koffein

Spezies	Fix. (h)*	geschädigte Metaphasen***	Aberrationsraten****							
			%				+ - + - +			
			+++	++	+	-	AL	B' + B"	RB' + sub-RB'	-
Mensch	I (2)	77,2	96,7		4,49	5,52	6,49	8,14	0,82	0,82
	II (4)	88	98,3		3,51	4,88	6,42	6,95	1,46	1,92
	III (6)	76	49		0,72	1,29	2,09	2,77	0,39	0,26
	IV (8)	62	30		0,46	0,48	1,13	1,04	0,47	0,17
Schimpanse	I (1)	97,1	100		5,25	3,5	7,49	7,45	0,97	0,63
	II (2)	98	91		2,71	3,74	8,02	6,2	2,55	0,89
	III (4)	92	64		1,36	1,37	2,62	2,22	0,93	0,34
	IV (6)	76	54		1,04	1,23	1,96	2,15	0,84	0,32
Schwein	I (0,5)	100	100		2,72	2,96	4,5	5,91	0,89	0,17
	II (1)	94	94,7		2,16	1,57	5,04	3,89	0,44	0,42
	III (2)	94,6	79,5		2,83	2,15	4,92	2,64	1,26	1,38
	IV (4)		54,5			0,16		0,7		0,84
Kaninchen	I (1)	100	100		3,46	3,28	8,78	8,28	0,79	0,72
	II (2)	100	100		2,32	3,42	7,17	7,76	1,36	1,36
	III (3)	82,3	71,4		1,52	0,86	3,52	3,43	0,82	0,08
	IV (5)	63,9	40,4		0,5	0,38	1	0,74	0,56	0,21

* Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

*** Werte aus den Tabellen 5.3.1.1, 5.3.2.1, 5.3.3.1 und 5.3.4.1

**** Werte aus den Tabellen 5.3.1.2, 5.3.2.2, 5.3.3.2 und 5.3.4.2

Darüberhinaus ist aus Tabelle 5.3.5.1 zu ersehen, daß die Raten geschädigter Metaphasen in den dritten und vierten Fixierungen koffeinbehandelter Kulturen größer sind als in Kulturen, die nicht mit Koffein behandelt waren.

Zwei Stunden nach Bestrahlung mit 200 rad und Koffeinbehandlung treten in den Lymphozytenkulturen von Mensch (Fix. I), Schimpanse (Fix. II), Schwein (Fix. III) und Kaninchen (Fix. II) zwischen 88 (Mensch) und 100 % (Kaninchen) geschädigte Zellen auf. In nicht-koffeinierten Kulturen liegen die Schädigungsraten zwischen 79,5 (Schwein) und 100 % (Kaninchen).

Der Vergleich der Markierungsindizes (MI), repräsentiert durch die Raten radioaktiv markierter Metaphasen zeigt, daß für die kultivierten Lymphozyten der verschiedenen Spezies große Unterschiede in Bezug auf das Fortschreiten der G2-Pase bestehen.

Aus Tabelle 5.3.5.2 ist zu entnehmen, daß die MI zunehmen, je später die Fixierung der Tritium-markierten Zellen erfolgte. Nach Bestrahlung der Kulturen mit 200 rad sind deutlich niedrigere MI als in den Kontrollen zu verzeichnen. Bei allen Spezies treten in den mit Koffein behandelten Kulturen im allgemeinen höhere MI als in nicht-koffeinierten Kulturen auf.

Sowohl in den Kontrollen als auch in den bestrahlten Kulturen menschlicher Lymphozyten waren zwei Stunden nach Bestrahlung (Fix. I) noch keine markierten Metaphasen zu beobachten. Nach dem gleichen Zeitintervall traten in unbestrahlten Kulturen von Schimansenlymphozyten (Fix. II) bereits 42 % (mit Koffein) beziehungsweise 25 % (ohne Koffein) markierte Metaphasen auf. Bei der Dosis von 200 rad waren 9 % beziehungsweise 2 % der

Metaphasen markiert. Ähnliche Verhältnisse sind beim Kaninchen (Fix. II) zu beobachten. Die Kontrollen weisen Markierungsindizes von 41 und 29 % auf. In bestrahlten Kulturen (200 rad) liegen die MI bei 13 und 2,5 %. Die Metaphasen der nach zwei Stunden fixierten Schweinelymphozyten waren in den Kontrollen zu 59 und 54 % und nach Bestrahlung mit 200 rad zu 16,5 und 2,5 % markiert.

Die zeitabhängige Zunahme der Markierungsindizes in unbestrahlten Lymphozytenkulturen von Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen ist auf den Abbildungen 5.3.5.1a -b, 5.3.5.2a -b, 5.3.5.3a -b und 5.3.5.4a -b in Form von Geraden dargestellt.

Die Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente, 50, 100 und 200 rad wurden zusammengefaßt und daraus für jede Fixierung ein korrekierter Markierungsindex für 100 rad berechnet. Dieser wurde unter der Voraussetzung einer umgekehrt linearen Abhängigkeit von der Dosis definiert als:

$$\text{korreg. MI}_{100 \text{ rad}} = n^{-1} \cdot \text{Summe} [D_i \cdot \text{MI}_i \cdot (100 \text{ rad})^{-1}]$$

Darin bedeuten:

MI	Markierungsindex
D	Dosis
i	indiziert zugeordnete Größen
n	Anzahl der Werte, für die ein $D_i \cdot \text{MI}_i$ größer als Null festgestellt wurde.

Die sich aus dieser Berechnung ergebenden Werte sind ebenfalls in den oben genannten Abbildungen als lineare Funktionen dargestellt und verdeutlichen durch ihre (meist parallele) zeitliche Verschiebung eine verzögernde Wirkung der Röntgenstrahlen auf die G2-Phase.

Tabelle 5.3.5.2

Der Einfluß von Koffein (CF) auf die Raten markierter Metaphasen (MI) in Lymphozytenkulturen von Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen, ohne (0 rad) und nach Bestrahlung mit 200 rad in der G2-Phase (Es wurden jeweils 100 Zellen ausgewertet.)

Spezies	Fix. (h)*	Dosis (rad)	MI (%)***		CF = $\frac{+}{-}$
			+++	---	
Mensch	I (2)	0	0	0	
		200	0	0	
	II (4)	0	12	13	0,92
		200	0	0	
	III (6)	0	40	35	1,14
		200	24	4	6
	IV (8)	0	54	45	1,2
		200	35	30	1,17
Schimpanse	I (1)	0	23	21	1,1
		200	0	0	
	II (2)	0	42	25	1,68
		200	9	2	4,5
	III (4)	0	43	30	1,43
		200	32	24	1,33
	IV (6)	0	54	55	0,98
		200	42,5	35	1,21
Schwein	I (0,5)	0	7	4	1,75
		200	0	0	
	II (1)	0	14	11	1,27
		200	0	0	
	III (2)	0	59	54	1,09
		200	16,5	2,5	6,6
	IV (4)	0		72	
		200		56	
Kaninchen	I (1)	0	11	7	1,57
		200	0	0	
	II (2)	0	41	29	1,41
		200	13	2,5	5,2
	III (3)	0		51	
		200	24,5	13	1,85
	IV (5)	0	77	64,5	1,19
		200	37	26,5	1,4

* Stunden nach Bestrahlung, radioaktiver Markierung und Koffeinbehandlung

** "+" = mit Koffein; "-" = ohne Koffein

*** Werte aus Tabellen 5.3.1.6, 5.3.2.6, 5.3.3.6 und 5.3.4.6

Davon ausgehend, daß die mittlere Dauer der G2-Phase etwa dem Zeitraum entspricht, in welchem in den Kulturen ein MI von 50 % erreicht wird, sind auf den Abbildungen für die Kontrollen die entsprechenden Koordinaten mit den dazugehörigen Werten eingetragen. Die sich als mittlere Dauer der G2-Phase mit und ohne Koffeinbehandlung ergebenden, ungefähren Zeiträume sind in Tabelle 5.3.5.3 vermerkt.

Tabelle 5.3.5.3

Die mittlere Dauer der G2-Phase, mit und ohne Koffeinbehandlung

Spezies	ungefähre Dauer der G2-Phase (h)		bei 100 rad	
	Kontrollen +*	-*	+*	-*
Mensch	7,3	8,3	9	10
Schimpanse	5,1	5,9	6	7,5
Schwein	1,8	2,6	2,6	3,5
Kaninchen	3,1	3,6	5	6,2

* "+" = mit Koffein, "-" = ohne Koffein

Abbildungen 5.3.5.1, 5.3.5.2, 5.3.5.3 und 5.3.5.4 (-a und -b)

Die Raten markierter Metaphasen (LABELLING INDEX (PERCENT)) mit (WITH CAFFEINE) und ohne Koffeinbehandlung (WITHOUT CAFFEINE) in Abhängigkeit von der Fixierungszeit (TIME (HRS)) in Kulturen der Lymphozyten von Mensch (MAN, Abb. 5.3.5.1a -b), Schimpanse (CHIMPANZEE, Abb. 5.3.5.2a -b), Schwein (PIG, Abb. 5.3.5.3a -b) und Kaninchen (RABBIT, Abb. 5.3.5.4a -b):

Darin bedeuten:

CONTROL	=	Kontrollen
IRRADIATED (POOLED DATA)	=	zusammengefaßte Ergebnisse aus den Bestrahlungsexperimenten (50 rad, 100 rad und 200 rad)

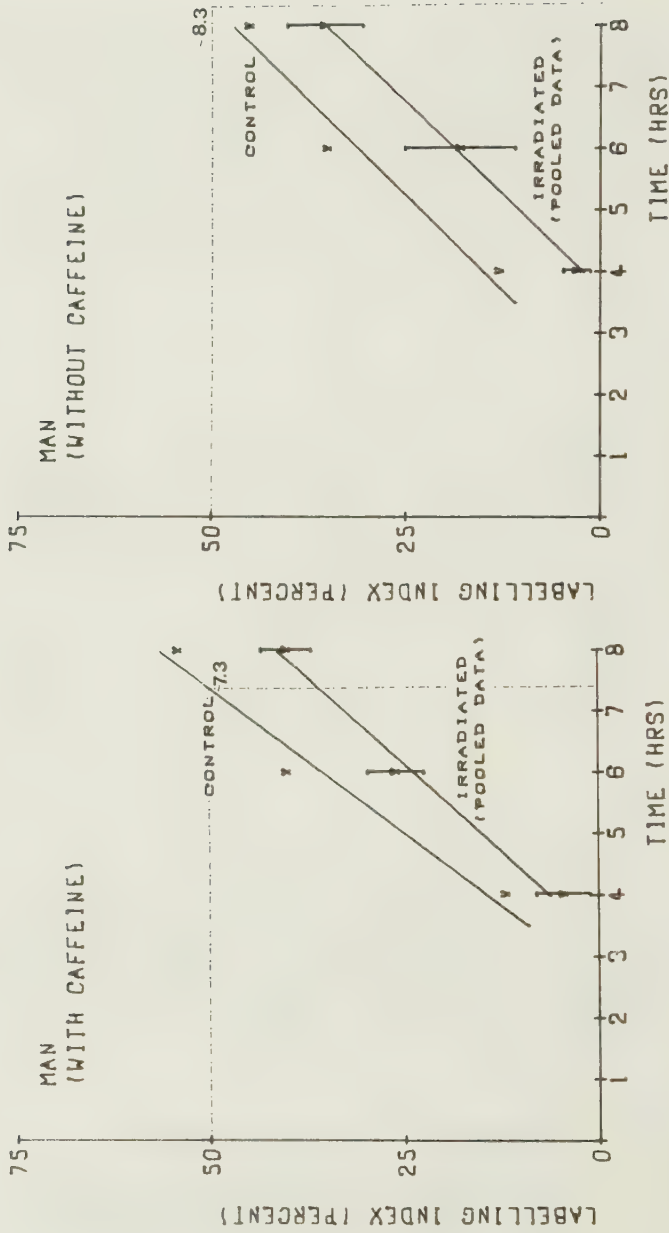


Abbildung 5.3.5.1a

Abbildung 5.3.5.1b

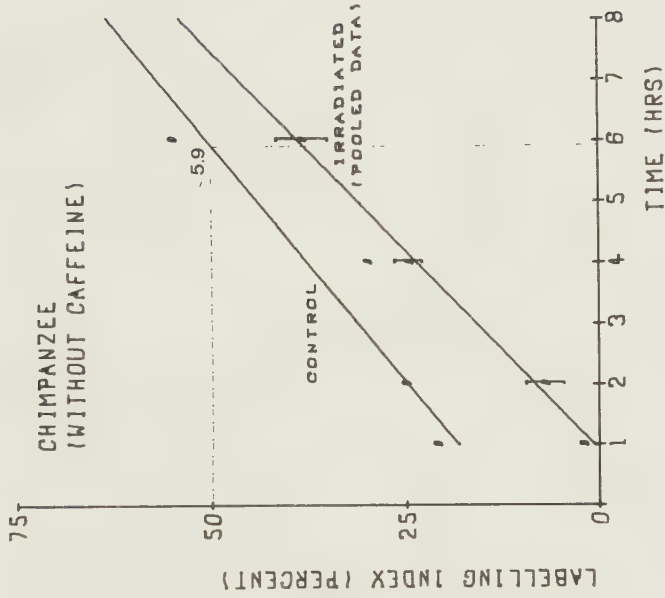


Abbildung 5.3.5.2b

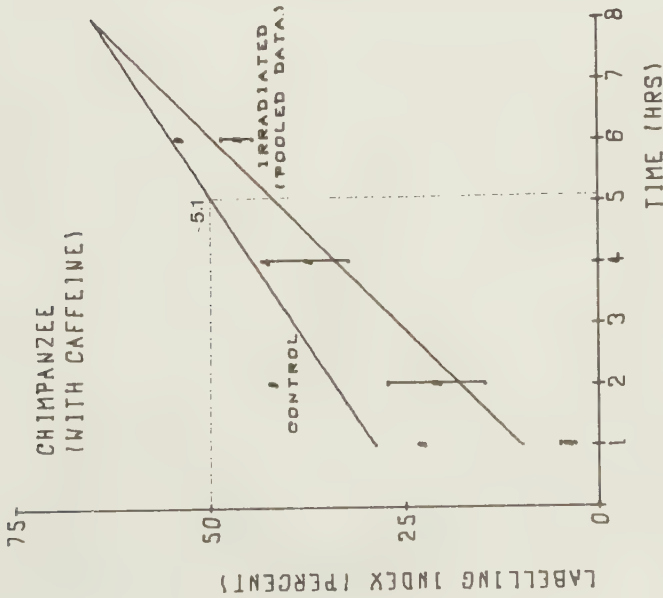


Abbildung 5.3.5.2a

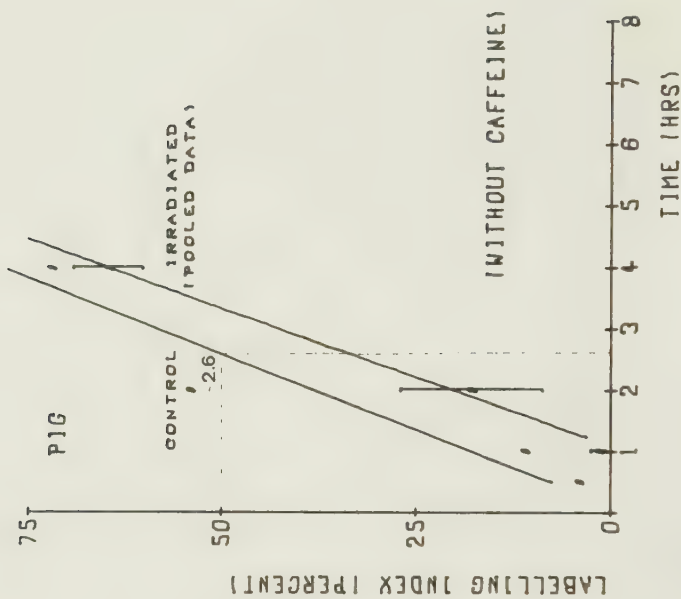


Abbildung 5.3.5.3a

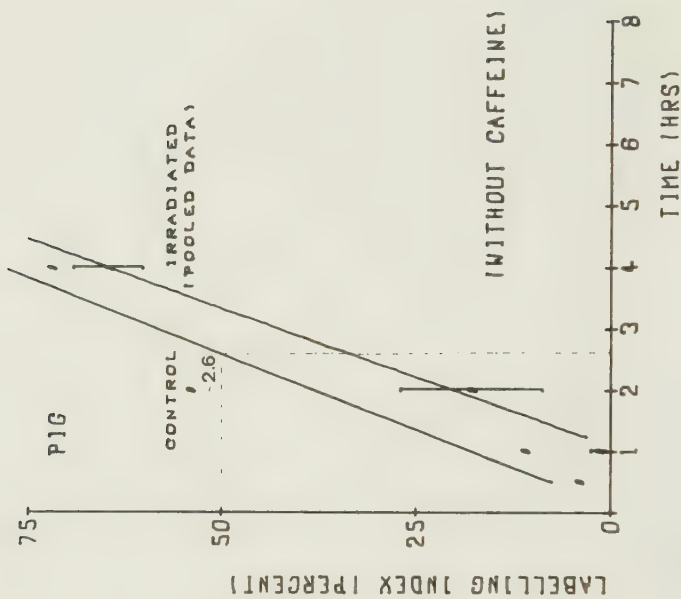


Abbildung 5.3.5.3b

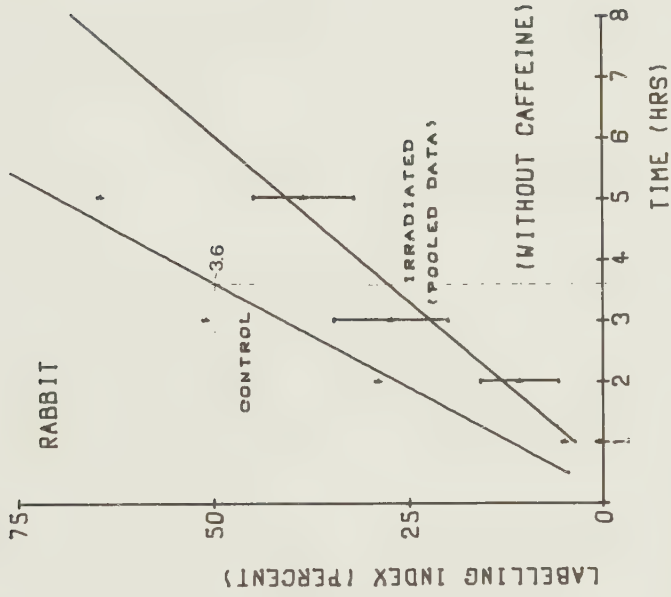


Abbildung 5.3.5.4b

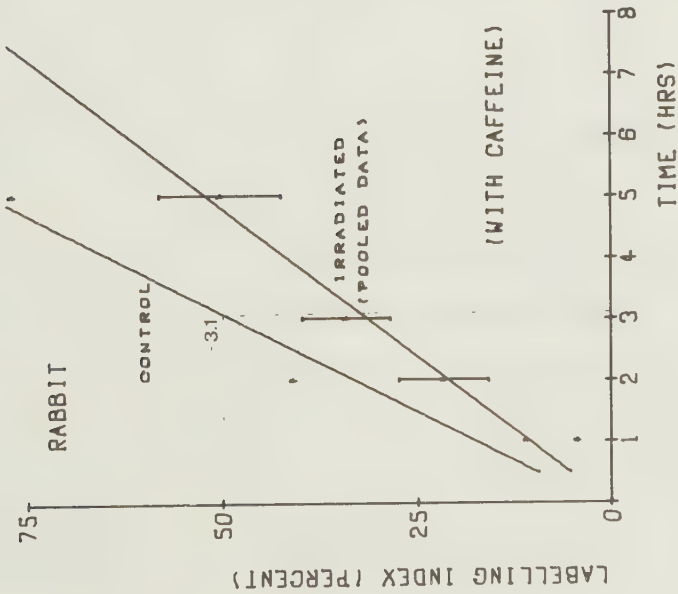


Abbildung 5.3.5.4a

6. DISKUSSION

6.1 Zellkinetik (A)

Die Zellkinetikanalysen haben für die Lymphozyten der vier untersuchten Spezies erhebliche Unterschiede ergeben. Die Dauer der Zellzyklen nimmt in der Reihenfolge Schwein, Kaninchen, Schimpanse und Mensch zu (siehe Tabelle 5.1.5.1).

Die Häufigkeitsverteilung erster, zweiter und weiterer Mitosen (M1, M2, M3) in den Kulturen menschlicher Lymphozyten ist in Abbildung 5.1.5.1 dargestellt und weicht zum Teil erheblich von Literaturwerten ab.

Die in der vorliegenden Arbeit nach 72 Stunden Kulturdauer ermittelten Raten aufeinanderfolgender Mitosen stimmen annähernd mit den Ergebnissen von Léonard und Decat [1979] und Purrott et al. [1980] überein. Die für 48 Stunden in der Literatur angegebenen Häufigkeiten für M1- und M2-Metaphasen zeigen jedoch keine Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Bianchi et al. [1979] fanden nach 48 Stunden für M1-Metaphasen Raten zwischen 97 und 98 % und für M2-Metaphasen zwischen 2 und 3 %. Nach 72 Stunden sind zwischen 36 und 69 % der Zellen in M1, zwischen 31 und 64 % in M2 und 1, bzw. 4 % in M3. Vor allem für die letzte Fixierungszeit zeigte die Untersuchung von Bianchi et al. [1979] an fünf Spendern große interindividuelle

Unterschiede. Ähnliche Unterschiede waren ebenfalls in dieser Arbeit nach 48 Stunden an vier beziehungsweise nach 72 Stunden an zwei Spendern zu verzeichnen (siehe Tabelle 5.1.1.2).

Für die Zellkinetik von Schimpansenlymphozyten (siehe Abbildung 5.1.5.2) liegen in der Literatur keine vergleichbaren Daten vor. Bereits nach 34 Stunden waren in den Kulturen M2- und nach 38 Stunden M3-Metaphasen zu beobachten. Nach 48 Stunden befanden sich $63,25 \pm 6,25$ % der Zellen in der ersten, $30,75 \pm 3,75$ % in der zweiten und $6 \pm 2,5$ % in der dritten Mitose. In den folgenden Fixierungen war eine im Vergleich zu menschlichen Lymphozyten stärkere Zunahme dritter Mitosen festzustellen (siehe Tabelle 5.1.2.3).

In den Kulturen von Schweinelymphozyten traten bei den drei untersuchten Spendern bereits nach 26 Stunden M2-Metaphasen auf (siehe Abbildung 5.1.5.3). Das Maximum zweiter Mitosen lag mit 53 % bei 42 Stunden. Nach 48 Stunden befanden sich $58 \pm 3,21$ % der Zellen in der dritten, $32,67 \pm 3,48$ % in der zweiten und $9,33 \pm 0,33$ % in der ersten Mitose (siehe Tabelle 5.1.3.3). Bianchi und Bianchi [1979] geben bei drei Spendern und der gleichen Fixierungszeit Raten von 5, 1 und 0 % für M3-, 63, 27 und 32 % für M2- und 32, 72 und 68 % für M1- Metaphasen an. Gemittelt würden diese Werte $57,33 \pm 12,72$ % für M1, $40,67 \pm 11,26$ % für M2 und $2 \pm 1,53$ % für M3 ergeben. Berücksichtigt man die aufgrund der großen Unterschiede der Einzelwerte relativ großen mittleren Fehler ($\pm$ SE), läßt sich für diese Fixierungszeit eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen vorliegender Arbeit feststellen.

Die Zellkinetik von Kaninchenlymphozyten (Abb. 5.1.5.3) wurde in den Kontrollen der Bestrahlungsexperimente untersucht (siehe Tabelle 5.1.4.1). Für die Häufigkeitsverteilung erster, zweiter und dritter Mitosen zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit den von Fabry und Léonard [1979], nach Kultivierung mit 200 rad bestrahlter Lymphozyten gefundenen Ergebnissen (siehe Tabelle 5.1.4.3)

Für die Unterschiede in der Zellkinetik und der Dauer der Zellzyklen der verschiedenen Spezies müssen genetische Faktoren als Ursache angenommen werden. Wie beim Menschen, so hat die Untersuchung auch bei den übrigen Spezies mehr oder weniger große interindividuelle Unterschiede ergeben. Welche Ursachen diese Unterschiede haben, ist bislang unbekannt.

Die Zellkinetikexperimente erlaubten eine Abschätzung der Zellzyklusdauer der Lymphozyten der verschiedenen Spezies und die Ergebnisse wurden verwendet, um so die Fixierungszeiten für die Untersuchung der G0-Strahlenempfindlichkeit (3.3) und die Bestrahlungs- und Behandlungszeiten (Thymidin, Koffein) der G2-Versuche (3.4) zu bestimmen.

In zahlreichen Metaphasen dritter Mitosen traten nach der differentiellen Färbung Chromosomen auf, in deren Chromatiden drei verschiedene Farbintensitäten beobachtet werden konnten (siehe Abbildung 4.4). Als mögliche Ursache dafür wird eine konzentrationsabhängige Inkorporation von BrdU in die DNS angenommen (4.3). In den Chromosomen von *Vicia faba* [Schvartzman, 1979] und von menschlichen Lungenfibroblasten [Miller et al., 1976]

wurde dieses Phänomen ebenfalls beobachtet und auf eine verminderte BrdU-Einbaurate während der dritten DNS-Replikation zurückgeführt.

Zwischen den Farbabstufungen, Dunkel (D), Intermediär (I) und Hell (H) sind alle Nuancen denkbar, so daß im Extremfall zwischen I und H oder D und I kein deutlicher Unterschied mehr zu erkennen ist (vergl. Abbildungen 4.3 und 4.4). Dieses Phänomen könnte dazu führen, daß sich Metaphasen aufeinanderfolgender Mitosen möglicherweise nicht mehr eindeutig klassifizieren lassen, was bei der Auswertung verschiedener Zellkinetikexperimente zu unterschiedlichen Raten erster, zweiter und weiterer Mitosen führen könnte. Eine genauere Untersuchung dieses Phänomens wäre im Hinblick auf eine Standardisierung der BrdU-Markierung und der differentiellen Färbemethoden von besonderem Interesse, weil dadurch präzisere und besser vergleichbare Analysen der Zellkinetik ermöglicht würden.

Ein weiterer wichtiger Befund ist, daß in den Kulturen von Schweinelymphozyten bereits nach 26 Stunden zwischen 2 und 8 % M2-Metaphasen auftraten (siehe Tabelle 5.3.3.1). Berücksichtigt man, daß eine gewisse Zeit für die Stimulation der Zellen erforderlich ist (G0-G1-Transformation), so läßt dieses Ergebnis eine Zellzyklusdauer von weniger als 13 Stunden vermuten. Es ergab sich daher die Frage, nach welcher Zeit in den Kulturen erste Mitosen zu erwarten sind. Hierzu wurden einzelne Versuche durchgeführt, die nicht unmittelbar Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren.

In normal angesetzten Kulturen (Ham's F-10 Medium, Serum, PHA) waren erste Metaphasen nach etwa 16 Stunden zu beobachten. Eine zwei-, vier-, sechs- und achttündige Inkubation der Schweine-lymphozyten in einer, Colchizin enthaltenden, isotonen Kochsalzlösung bei 37 Grad C lieferte einige Mitosen. Selbst nach Fixierung frisch gesammelten Blutes (direkte Fixierung) waren auf den Präparaten einzelne Metaphasen zu erkennen. Daraufhin wurde, im Abstand mehrerer Tage, das Blut von insgesamt sieben Tieren untersucht. Der stets gleiche Befund ist nur durch das Vorhandensein teilungsaktiver Zellen im zirkulierenden Blut der Tiere erklärbar. Der Befund von McFee und Banner [1969], daß in Schweinelymphozyten eine Stunde nach Kulturansatz und Behandlung mit tritiiertem Thymidin für 25 Minuten einzelne, radioaktiv markierte Zellen auftraten, weist ebenfalls darauf hin, daß sich im peripheren Blut des Schweins bereits Zellen im Zellzyklus befinden. Bei Mensch, Schimpanse und Kaninchen traten nach direkter Fixierung der Blutzellen keine Metaphasen auf. Auf einigen Präparaten waren jedoch Zellen zu beobachten, die in ihrer Größe und der Chromatinverteilung im Zellkern transformierten Lymphozyten nach PHA-Stimulation ähnelten.

Welche Bedeutung diese Befunde für das Lymphozyten-Test-System haben, ist allerdings unklar und müßte durch gezieltere Experimente festgestellt werden.

6.2 Die Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten während der G₀-Phase (B)

Als Maß für die Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten von Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen wurden dizentrische Chromosomen und Ringchromosomen ausgewertet. An differentiell gefärbten Präparaten wurden Metaphasen der ersten Mitose (M1) und der zweiten Mitose (M2) getrennt analysiert. Darüberhinaus wurden M2-Metaphasen noch hinsichtlich des Auftretens von PCC untersucht.

In M1-Metaphasen nahmen die Raten dizentrischer Chromosomen und Ringchromosomen im Dosisbereich bis 400 rad bei allen untersuchten Spezies mit dem Quadrat der Dosis zu (siehe Abbildungen 5.2.1.2, 5.2.2.2, 5.2.3.2 und 5.2.4.2). Bei den Lymphozyten von Mensch, Schimpanse und Kaninchen nahm die Häufigkeit von PCC in M2-Metaphasen mit steigender Dosis zu (siehe Tabellen 5.2.1.4, 5.2.2.5 und 5.2.4.5). Für Schweinelymphozyten konnte keine dosisabhängige Zunahme der PCC-Rate beobachtet werden (siehe Tabelle 5.2.3.5).

Bei der Zellteilung kann ein dizentrisches Chromosom entweder ungehindert auf die Tochterzellen verteilt werden, oder es kann nach Bildung einer Anaphasebrücke zwischen den beiden Zentromeren zerreißen. Nach einer ungehinderten Verteilung enthalten die Tochterzellen jeweils ein dizentrisches Chromosom; im anderen Fall gehen die dizentrischen Chromosomen verloren.

Die Raten dizentrischer Chromosomen, die in M2-Metaphasen nach Bestrahlung mit 200 rad aufgetreten sind, betragen bei allen untersuchten Spezies etwa 50 % der für M1-Metaphasen gefundenen Werte (siehe Tabelle 5.2.5.2). Aufgrund der alternativen Möglichkeit der Verteilung dizentrischer Chromosomen während der Anaphase entspricht dieser Befund der Erwartung und macht das Vorkommen des von McClintock [1941] im Maisendosperm gefundenen Bruch-Fusions-Brückenzyklus bei Lymphozyten unwahrscheinlich. Beim Vorliegen eines Bruch-Fusions-Brückenzyklus wären in zweiten Mitosen deutlich mehr als 50 % der in M1-Metaphasen gefundenen dizentrischen Chromosomen zu erwarten.

Für Strahlendosen von 300 und 400 rad lagen die Frequenzen dizentrischer Chromosomen in M2-Metaphasen unter dem 50 %-Niveau der M1-Werte (siehe Tabellen 5.2.1.3, 5.2.2.4, 5.2.3.4 und 5.2.4.4). Dieser Sachverhalt könnte auf das vermehrte Absterben geschädigter Zellen nach Bestrahlung hinweisen [Kutlaka et al., 1982; Murai et al., 1979; Grote et al., 1981a; 1981b].

Die dosisabhängigen Raten der Ringchromosomen waren in M1- und M2-Metaphasen nahezu gleich, was für das Vorhandensein eines Bruch-Fusions-Brückenzyklus sprechen könnte. Eine einfachere Erklärung dieses Sachverhaltes wäre aber, daß die Mehrzahl der Ringe die Mitose ungehindert durchläuft, sodaß beide Tochterzellen je einen Ring enthalten. Ein Zerreißen der Ringe nach Brückenbildung ist nur dann möglich, wenn ein Austausch der Schwesterchromatiden (SCE) stattgefunden hat. Bei SCE-Raten zwischen 4,27 (Kaninchen) und 6,86 (Mensch) pro Zelle (siehe Tabelle 5.1.5.3) ergibt sich mit 0,1 beziehungsweise 0,15 eine nur sehr geringe mittlere Wahrscheinlichkeit für das Eintreten

eines SCEs innerhalb eines Chromosoms. Für Ringchromosomen ist die SCE-Rate noch niedriger, weil meist nur kleinere Abschnitte der Chromosomenarme beiderseits des Zentromers in die Aberration einbezogen sind, und die Häufigkeit von SCEs von der Länge des jeweiligen Chromosoms abhängt.

Wie für dizentrische Chromosomen waren auch für Ringchromosomen bei höheren Dosen (300 und 400 rad) in M2-Metaphasen niedrigere Raten zu verzeichnen. Dieser Effekt könnte ebenfalls auf einem strahleninduzierten Zelltod beruhen.

Nach Röntgenbestrahlung menschlicher Lymphozyten mit 200 rad traten in M1-Metaphasen 0,36 dizentrische Chromosomen pro Zelle auf (siehe Tabelle 5.2.5.2). Dieser Wert stimmt gut mit den Ergebnissen aus anderen, ähnlichen Untersuchungen überein: Die Raten dizentrischer Chromosomen betrugen darin 0,315 [Léonard und Decat, 1979], 0,34 [de Boer et al., 1977] und 0,335 [Bianchi et al. 1979] pro Zelle. Nach 200 rad Gammastrahlung wurden 0,273 dizentrische Chromosomen pro Zelle beobachtet [Takahashi et al., 1979]. Im Rahmen einer IAEA-Studie [Bianchi et al., 1982] wurden in verschiedenen Labors, bei der Analyse überwiegend erster Mitosen (wenigstens 99 %), zwischen 0,114 und 0,482 dizentrische Chromosomen pro Zelle festgestellt.

Für Schimpansenlymphozyten waren pro Metaphase der ersten Mitose nach Bestrahlung mit 200 rad 0,69 dizentrische Chromosomen pro Zelle zu verzeichnen (siehe Tabelle 5.2.5.2). Die Untersuchung von Léonard et al. [1977] an Schimpansenlymphozyten, die ohne BrdU-Behandlung für 48 Stunden kultiviert worden waren, ergab eine mittlere Rate von 0,455 dizentrischen Chromosomen

pro Zelle. Berücksichtigt man, daß nach 48 Stunden Kulturdauer mehr als 35 % der Zellen bereits ihre zweite beziehungsweise dritte Mitose durchlaufen (siehe Tabelle 5.2.2.3), so ist für Metaphasen ausschließlich erster Mitosen eine deutlich höhere Rate dizentrischer Chromosomen anzunehmen.

In der Untersuchung von Bianchi et al. [1981] an Schweinelymphozyten, die mit 200 rad bestrahlt und in Gegenwart von BrdU kultiviert worden waren, wurden in nicht differentiell gefärbten Metaphasen 0,13 dizentrische Chromosomen pro Zelle festgestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch 0,32 dizentrische Chromosomen pro M1-Metaphase ermittelt. Dieser Unterschied ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß Bianchi et al. [1981] den Kulturen erst drei Stunden nach Ansatz BrdU zusetzten. Ein Einfluß des Zeitpunktes der BrdU-Zugabe auf die in nicht differentiell gefärbten Metaphasen ermittelten Aberrationsraten läßt sich durch die folgenden Befunde erklären: Bei Schweinelymphozyten konnte unmittelbar nach Kulturbeginn und Behandlung mit tritiiertem Thymidin DNS-Synthese nachgewiesen werden [McFee und Banner, 1969]. In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, daß Schweinelymphozyten schon im Blutkreislauf mitotisch aktiv sind (siehe 6.1), und daß sie sehr bald nach Kulturansatz ihre erste in vitro-Mitose durchlaufen. Bereits 26 Stunden nach Ansatz treten in den Kulturen zweite Mitosen auf, deren Häufigkeit danach stark zunimmt (siehe Abbildung 5.1.5.3). Ein verzögerter Beginn der BrdU-Behandlung führt demnach in den Kulturen zu einem vermehrten Auftreten von Metaphasen zweiter Mitosen, die aber nur eine Replikationsrunde in Gegenwart von BrdU durchlaufen haben und somit nicht differen-

tiell gefärbt sind. Dieser Effekt wird beim Vergleich der Zellkinetikanalysen beider Untersuchungen deutlich. Bei sofortiger BrdU-Zugabe [diese Arbeit] befinden sich nach 48 Stunden Kulturdauer nur noch 9,33 % der Zellen in ihrer ersten in vitro-Mitose (siehe Tabelle 5.1.3.3); bei einer drei Stunden nach Kulturansatz beginnenden BrdU-Behandlung zeigten mehr als 58 % der Zellen keine differentielle Färbung und wurden von Bianchi et al. [1981] als M1-Metaphasen angesehen. Aufgrund dieser Befunde ist anzunehmen, daß von den Autoren, selbst unter Berücksichtigung einer möglichen, strahleninduzierten Zellzyklusverzögerung, zum großen Teil M2-Metaphasen nach Bestrahlung ausgewertet worden sind, wodurch sich die im Vergleich zu vorliegender Arbeit niedrigeren Aberrationsraten erklären lassen.

In M1-Metaphasen nach Bestrahlung von Kaninchenlymphozyten mit 200 rad wurden 0,25 dizentrische Chromosomen pro Zelle ermittelt. Fabry und Léonard [1979] fanden unter denselben Bestrahlungs- und Kulturbedingungen (beide Untersuchungen wurden im gleichen Labor durchgeführt) und bei Auswertung ausschließlich erster Mitosen nach Bestrahlung 0,275 dizentrische Chromosomen pro Zelle. Die Untersuchung von Wyszynska und Liniecki [1980] erbrachte ein anderes Resultat. Nach Gammabestrahlung von Kaninchenlymphozyten bei 37 Grad C mit 250 rad (2,5 Gy) wurden in M1-Metaphasen 0,135 dizentrische Chromosomen pro Zelle festgestellt. Dieser Wert entspricht etwa der Hälfte der Raten, die in der vorliegenden Untersuchung und in der Untersuchung von Fabry und Léonard [1979] nach Röntgenbestrahlung bei Zimmertemperatur ermittelt wurden. In M1-Metaphasen der Lymphozyten von Mensch und Schwein fanden Wyszynska und Liniecki [1980] 0,172

beziehungsweise 0.121 dizentrische Chromosomen pro Zelle. Diese Werte sind ebenfalls nur etwa halb so hoch wie die aus vorliegender Arbeit. Eine Erklärung für diese Diskrepanzen kann nicht gegeben werden.

Die größte Strahlenempfindlichkeit wurde in der vorliegenden Untersuchung bei Schimpansenlymphozyten festgestellt. Die dosisabhängigen Raten chromosomaler Aberrationen (dizentrische Chromosomen und Ringchromosomen), die für die Lymphozyten von Mensch, Schwein und Kaninchen in Metaphasen erster Mitosen nach G₀-Bestrahlung ermittelt wurden, betragen etwa die Hälfte der für Schimpansenlymphozyten gefundenen Werte (siehe Abbildungen 5.2.5.2 und 5.2.5.3). Setzt man die in menschlichen Lymphozyten aufgetretene Aberrationsrate ins Verhältnis zu den für die einzelnen Spezies ermittelten Raten, so ergibt sich daraus eine zum Menschen relative Strahlenempfindlichkeit. Für menschliche Lymphozyten hat diese demnach den Wert 1. Beim Vergleich der nach Bestrahlung mit 200 rad in M₁-Metaphasen aufgetretenen Raten dizentrischer Chromosomen (siehe Tabelle 5.2.5.2) sind Schimpansenlymphozyten 1,81 mal so empfindlich wie die des Menschen. Für Schweinelymphozyten beträgt die relative Strahlenempfindlichkeit 0,89 und für Kaninchenlymphozyten 0,69. Dieses Resultat läßt sich mit der von Brewen et al., [1973; 1974] entwickelten "arm number" Hypothese (ANH) nicht erklären, wonach die effektive Rate dizentrischer Chromosomen linear von der Zahl der Chromosomenarme abhängen soll. Demzufolge dürften Schimpansenlymphozyten mit 83 Chromosomenarmen, relativ zu menschlichen Lymphozyten mit 81 Chromosomenarmen, nur die 1,02-

fache Rate dizentrischer Chromosomen aufweisen. Für Schweine-Lymphozyten mit 64 Chromosomenarmen hätte sich eine relative Strahlenempfindlichkeit von 0,79 ergeben müssen, und Kaninchen-Lymphozyten hätten mit 80 Chromosomenarmen etwa die gleiche (0,98-fache) Rate dizentrischer Chromosomen wie menschliche Lymphozyten aufweisen müssen. Es liegt nahe, wie auch in verschiedenen anderen Arbeiten zum Ausdruck gebracht wird, daß genetische, die Reparatur strahleninduzierter Chromosomenschäden betreffende Faktoren für die nach Bestrahlung auftretenden Aberrationsraten verantwortlich sind [Sankaranarayanan, 1976].

6.3 Die Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten während der G2-Phase und der Einfluß von Koffein (C)

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Dosis- und die Zeitabhängigkeit der Aberrationsraten nach Bestrahlung von Lymphozyten während der G2-Phase des Zellzyklus und der Einfluß von Koffein auf die Aberrationsraten untersucht. Die Untersuchungen wurden mit den peripheren Lymphozyten je eines Spenders von Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen durchgeführt. Die Zellen wurden mit 0, 50, 100 und 200 rad bestrahlt und anschließend in vier aufeinander folgenden Intervallen aufgearbeitet. (Fixierungen I, II, III und IV). Je Dosis und Fixierung wurde eine Kultur mit Koffein behandelt; eine weitere Kultur blieb unbehandelt. Die Analyse derjenigen Zellen, die

sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G₂-Phase befunden haben wurde ermöglicht, indem alle Kulturen unmittelbar nach der Bestrahlung mit tritiiertem Thymidin (³H-TdR) behandelt wurden (3.4). Nach erfolgter Autoradiographie (2.4) konnten markierte und unmarkierte Metaphasen unterschieden werden. Alle nicht markierten Metaphasen müssen demnach Zellen sein, die sich zum Zeitpunkt der ³H-TdR-Behandlung in der G₂-Phase befunden haben. Nur diese wurden im Hinblick auf strukturelle Aberrationen untersucht.

Das Verhältnis von markierten zu unmarkierten Metaphasen (Markierungsindex = MI) ist ein Maß für das Fortschreiten der G₂-Phase. Mit fortschreitender Kulturdauer wurde eine Zunahme des MI festgestellt. Nach Bestrahlung der Kulturen waren bei gleichen Fixierungszeiten niedrigere MI als in den Kontrollen zu beobachten. Dieser Effekt zeigt sich am deutlichsten bei der höchsten Dosis (200 rad) und weist darauf hin, daß die G₂-Phase der Zellen durch Röntgenstrahlen verzögert wurden (siehe Tabelle 5.3.5.2). Dieser Befund steht im Einklang mit Literaturdaten [siehe Bases et al., 1980]. Die Behandlung der Zellen mit Koffein führte in bestrahlten und unbestrahlten Kulturen zu einer Erhöhung der Markierungsindizes. Koffein beschleunigt somit die G₂-Phase, ein Befund, der auch von anderen Autoren erhoben wurde [siehe Palitti et al., 1983].

Als mittlere Dauer der G₂-Phase wurde der Zeitraum festgelegt, in welchem ein MI von 50 % erreicht wurde. Zwischen den verschiedenen Spezies wurden diesbezüglich erhebliche Unterschiede

Tabelle 6.3.1

Die Markierungsindizes in unbestrahlten Kulturen menschlicher Lymphozyten nach verschiedener Behandlungsdauer mit ^3H -TdR

Spender	Behandlung mit ^3H -TdR (h)	Markierungsindex (%)				
		++	+ SE	-*	+ SE	-*
Ma**	2					0
Ma***	2	0		0		
Ma****	2	0	0,25	0	0	
Mb****	2	1	+ 0,25	0		
Mc****	2	0		0		
Ma**	4					25,2
Ma***	4	12		13		
Ma****	4	17	14,25	13	14,25	
Mb****	4	17	+ 1,6	17	+ 0,95	
Mc****	4	11		14		
Ma**	6					92
Ma***	6	40		35		
Ma****	6	42	42,75	37	36,75	
Mb****	6	48	+ 1,8	36	+ 0,85	
Mc****	6	41		39		
Ma****	8	54		45		
Ma****	8	58	55,5	43	45,5	
Mb****	8	58	+ 1,5	46	+ 2,17	
Mc****	8	52		48		

* "+" = mit Koffein, "-" = ohne Koffein
 ** verschiedene Zeiten der ^3H -TdR-Zugabe vor der Fixierung nach 48 Stunden
 *** verschiedene Fixierungszeiten nach ^3H -TdR-Zugabe bei 60 Stunden (Ergebnisse aus Tabelle 5.3.1.6)
 **** verschiedene Fixierungszeiten nach ^3H -TdR-Zugabe bei 60 Stunden (Zusatzversuche)

festgestellt (siehe Tabelle 5.3.5.3). Für menschliche Lymphozyten (Spender Ma) ergab sich in der nicht mit Koffein behandelten Kontrolle eine mittlere Dauer der G2-Phase von 8,3 Stunden. In der Literatur wird für die G2-Phase in den peripheren Lymphozyten des Menschen eine Dauer zwischen 2 und 9 Stunden angegeben [siehe Trepel, 1975]. Eine zusätzliche Analyse mit dem

Blut von zwei weiteren Spendern (Mb und Mc), sowie eine Überprüfung mit dem Blut des Spenders "Ma" ergaben bei gleichen Versuchsbedingungen ähnliche Ergebnisse. Die Markierungsindizes waren zu den jeweiligen Fixierungszeiten 2, 4, 6 und 8 Stunden nach $^3\text{H-TdR}$ -Zugabe nahezu gleich (siehe Tabelle 6.3.1). Ein weiterer Versuch, der mit dem Blut des Spenders "Ma" durchgeführt worden war, ergab bei einer Kulturdauer von 48 Stunden und einer $^3\text{H-TdR}$ -Zugabe zu verschiedenen Zeiten vor der Fixierung eine kürzere G2-Phase. Bei einer Behandlungsdauer mit $^3\text{H-TdR}$ von 2 Stunden waren keine markierten Metaphasen zu beobachten. Nach vierstündiger Behandlung waren bereits 25,2 % der Metaphasen markiert, und nach 6 Stunden trat ein MI von 92 % auf (siehe Tabelle 6.3.1). Der MI von 50 % liegt demzufolge zwischen der 4. und der 6. Stunde, womit in diesem Versuch die mittlere Dauer der G2-Phase mehr als zwei Stunden kürzer war als in den zuvor beschriebenen Experimenten. Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, daß die Zellen mit zunehmender Kulturdauer verlängerte G2-Phasen aufweisen. Eine weitere Ursache für die extrem lange G2-Phase in den 3-Tage-Kulturen (62 bis 68 Stunden) könnte auch in der unterschiedlichen Versuchsdurchführung liegen. Die 48-Stunden-Kulturen waren außer durch die Zugabe von $^3\text{H-TdR}$ und Colchizin keiner weiteren Manipulation ausgesetzt. In den 3-Tage Kulturen hingegen wurden die Zellen möglicherweise durch den Versuchsablauf (3.4) in ihren Zellzyklen beeinträchtigt (Transport im Wasserbad, Verteilen der 32 ml-Kulturen auf kleinere Kulturgefäße). Diese Eingriffe könnten zu einer Verzögerung der G2-Phase geführt haben.

In den Lymphozyten aller untersuchten Spezies wurden für jede Fixierungszeit mit steigender Dosis zunehmende Aberrationsraten gefunden (siehe Tabellen 5.3.1.2, 5.3.2.2, 5.3.3.2 und 5.3.4.2). Für alle Spezies waren die dosisabhängigen Raten der Läsionen und Brüche umso niedriger, je später die Zellen nach der Bestrahlung fixiert wurden (siehe Abbildungen 5.3.1.3a -b, 5.3.1.4a -b, 5.3.2.3a -b, 5.3.2.4a -b, 5.3.3.3a -b, 5.3.3.4a -b, 5.3.4.3a -b und 5.3.4.4a -b). Dieses Ergebnis weist auf eine Abhängigkeit zwischen Reparatur und der dafür zur Verfügung stehenden Zeit hin. Die Raten der durch Reunion vereinigten Chromatid- und Subchromatidbrüche (RB' und sub-RB') hängen ebenfalls vom Bestrahlungszeitpunkt während der G2-Phase ab. Die Häufigkeitsverteilungen dieser Aberrationen sind bei den verschiedenen Spezies für die Dosen 50 und 100 rad ähnlich (siehe Abbildungen 5.3.1.5a -b, 5.3.2.5a -b, 5.3.3.5a -b und 5.3.4.5a -b). Bei Bestrahlung mit 200 rad nahmen die Raten von der frühen bis etwa zur mittleren G2-Phase (Fixierung IV bis Fixierungen II bzw. II) zu; am Ende der G2-Phase waren sie bei allen Spezies niedriger als in der mittleren G2-Phase (siehe o.g. Abbildungen, siehe Tabelle 5.3.5.1). Die Abnahme der Austausche am Ende der G2-Phase nach Bestrahlung mit 200 rad könnte auf einer erhöhten Absterberate der Zellen beruhen.

Die Behandlung der Zellen mit Koffein in der G2-Phase hatte keinen systematischen Effekt auf die Aberrationsraten. Es zeigt sich aber die Tendenz, daß, bei Bestrahlung früher G2-Stadien, mit Koffein mehr RB' auftreten als ohne Koffein. Die AL und Brüche werden in ihrer Häufigkeit durch Koffein nicht deutlich

beeinflusst (siehe Tabelle 5.3.5.1). Die durch Koffein bedingte Beschleunigung der G2-Phase hatte daher kaum einen Effekt auf die Aberrationsraten. Das Fehlen eines deutlichen Koffeineffektes auf die strahleninduzierten Aberrationen bei menschlichen Lymphozyten könnte eine Eigenschaft der Zellen des verwendeten Blutes (Spender Ma) sein. Für strahleninduzierte Chromosomenaberrationen in menschlichen Lymphozyten diskutieren Natarajan et al. [1980] eine interindividuelle Variation im Hinblick auf die Wirkung von Koffein. Sie bestrahlten 3-Tage-Kulturen peripherer Lymphozyten von 21 Probanden 3 Stunden vor der Fixierung mit 200 rad und behandelten die Zellen sofort nach der Bestrahlung mit Koffein (1mM). Im Hinblick auf Chromatidbrüche und Chromatidenaustausche ergaben sich zwischen koffeinbehandelten und unbehandelten Kulturen erhebliche Unterschiede. Die Strahlensensitivität variierte zwischen den Probanden um das 7-fache, und die Koffeinwirkung schwankte zwischen 0 (bei 6 Individuen) und einer Steigerung um das mehr als 4-fache (bei 2 Individuen). Der Modifikationseffekt des Koffeins war von der Höhe der Aberrationsraten unabhängig. Die in dieser Arbeit analysierten Zellen des Spenders "Ma" waren offenbar resistent gegen Koffein. Es soll aber hier darauf hingewiesen werden, daß auch in den Lymphozyten der untersuchten Tiere kein deutlicher Koffeineffekt nachweisbar war. Dieses Ergebnis kann nicht kommentiert werden, weil es hierzu keine Vergleichsuntersuchungen mit anderen Individuen gibt.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Zellkinetik und die GO-Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten von Mensch, Schimpanse, Schwein und Kaninchen wurden unter Verwendung des Lymphozyten-Testsystems (Ham's F-10 Medium, PHA) untersucht.

Die Zellen wurden in Gegenwart von BrdU kultiviert und nach Colchizinbehandlung (10^{-5} M) hypotonisiert (0,075 M KCl) und fixiert (Methanol + Essigsäure = 3 + 1).

Aufgrund des Einbaus von BrdU in die DNS (S-Phase) konnte nach der, entsprechend dem Markierungsmuster erfolgten, differentiellen Färbung der Metaphasechromosomen zwischen ersten, zweiten und dritten Mitosen (M1, M2 und M3) unterschieden werden.

Bei den Zellkinetikanalysen ergaben sich für Schweine- und Kaninchenlymphozyten, mit 8 bis 11 Stunden die kürzesten Zellzyklen. Beim Schimpansen betrug die Dauer des Zellzyklus 13 bis 16 Stunden. Die mittlere Zellzyklusdauer menschlicher Lymphozyten lag bei etwa 23 Stunden.

Für die Unterschiede in der Zellkinetik der verschiedenen Spezies werden genetische Faktoren als Ursache angenommen.

Bei der Überprüfung der GO-Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten wurden die Raten chromosomaler Aberrationen in Metaphasen der ersten und der zweiten Mitosen, getrennt ausgewertet.

In Metaphasen ausschließlich erster Mitosen nach Bestrahlung mit 200 rad wurde für Schimpansenlymphozyten eine fast doppelt so hohe (1,8-fache) Rate dizentrischer Chromosomen wie für die Lymphozyten des Menschen festgestellt. Bei dieser Dosis waren Schweinelymphozyten 0,9 mal und Kaninchenlymphozyten 0,7 mal so empfindlich wie menschliche Lymphozyten.

Die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit wird auf spezies-spezifische Unterschiede in der Reparaturkapazität der Lymphozyten zurückgeführt.

In den Metaphasen zweiter Mitosen traten etwa die halben Raten dizentrischer Chromosomen wie in M1-Metaphasen auf. Ringchromosomen waren in M2-Metaphasen fast genauso häufig zu beobachten wie in M1-Metaphasen.

Im folgenden Teil der Arbeit wurde der Einfluß von Koffein auf die Aberrationsraten nach Bestrahlung der Lymphozyten während der G2-Phase untersucht. Eine selektive Auswertung der Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G2-Phase befunden hatten, wurde durch die Behandlung der Kulturen mit tritiiertem Thymidin, unmittelbar nach Bestrahlung ermöglicht.

In unmarkierten Metaphasen wurden achromatische Läsionen, offene Chromatidbrüche und vereinigte Chromatidbrüche (Translokationen) ausgewertet. Die Raten der Aberrationen nahmen mit steigender Dosis zu und sanken mit zunehmender Kulturdauer nach Bestrahlung ab.

Ein deutlicher Koffeineffekt auf die Aberrationsraten wurde nicht nachgewiesen.

Als Maß für das Fortschreiten der G₂-Phase wurde die Rate radioaktiv markierter Metaphasen (MI = Markierungsindex) angenommen. Mit fortschreitender Kultivierung nahm die Rate markierter Metaphasen in den Kulturen zu.

Nach Röntgenbestrahlung waren die in den Kulturen für jede Fixierung ermittelten MI kleiner als in den Kontrollen, woraus eine strahleninduzierte Verzögerung der G₂-Phase abgeleitet wird. Nach Koffeinbehandlung waren die Markierungsindizes in allen Kulturen erhöht, was einer Beschleunigung der G₂-Phase durch Koffein gleichkommt.

Die mittlere Dauer der G₂-Phase wurde auf den Zeitpunkt des Erreichens eines MI von 50 % festgelegt. Dieser Wert wurde von menschlichen Lymphozyten nach 8,3 Stunden, von Schimpansenlymphozyten nach 5,9 Stunden, von Schweinelymphozyten nach 2,6 Stunden und von Kaninchenlymphozyten nach 3,6 Stunden erreicht. Durch die Koffeinbehandlung wurde die G₂-Phase der Lymphozyten des Menschen um 1 Stunde, des Schimpansen und Schweins um jeweils 0,8 Stunden und des Kaninchens um 0,5 Stunden verkürzt.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adler, I.-D.: Does caffeine induce dominant lethal mutations in mice? *Humangenetik* 7, 137-148 (1969)
- Altenburg, E.: The limit of radiation frequency effective in producing mutations. *Amer. Nat.* 62, 540-545 (1928)
- Arakaki, D.T., Sparkes, R.S.: Microtechniques for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics* 2, 57-60 (1963)
- Bajerska, A., Liniecki, J.: The influence of X-ray dose and time of its delivery in vitro on the yield of chromosomal aberrations in the peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 16, 467-481 (1969)
- Bajerska, A., Liniecki, J.: The yield of chromosomal aberrations in rabbit lymphocytes after irradiation in vitro and in vivo. *Mutat. Res.* 27, 271-284 (1975)
- Barendsen, G.W.: Influence of radiation quality on the effectiveness of small doses for induction of reproductive death and chromosome aberrations in mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 36, 49-63 (1979)
- Bases, R., Mendez, F., Liebeskind, D., Elequin, F., Neubort, S.: DNA of HeLa cells during caffeine-promoted recovery from X-ray induced G2 arrest. *Int. J. Radiat. Biol.* 37, 437-445 (1980)
- Bauchinger, M.: Chromosome aberrations in human lymphocytes as a quantitative indicator of radiation exposure. In: H.J. Evans and D.C. Lloyd (eds.), *Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man*, Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 9-13, 1978,
- Bauer, H.: Röntgenauslösung von Chromosomenmutationen bei *Drosophila melanogaster*. I. Bruchhäufigkeit, -verteilung und Rekombination nach Speicheldrüsenuntersuchungen. *Chromosoma (Berl.)* 1, 343-390 (1939)
- Bauer, H.: Röntgenauslösung von Chromosomenmutationen bei *Drosophila melanogaster*. II. Die Häufigkeit des primären Bruchereignisses nach Untersuchungen am Ring-X-Chromosom. *Chromosoma (Berl.)* 2, 407-458 (1942)
- Becker, H.J.: Untersuchungen zur Wirkung des Heterochromatins auf die Genmanifestierung bei *D. melanogaster*. *Zool. Anzeige Suppl.* 24, 283-291 (1961)

- Beek, B., Obe, G.: The human leucocyte test system. IV. The RNA-synthesis pattern in the first G₁-phase of the cell cycle after stimulation with PHA. *Mutat. Res.* 29, 165-168 (1975)
- Beek B., Obe, G: The human leucocyte test system. X. Higher sensitivity to X-irradiation in the G₀ stage of the cell cycle of early as compared to late replicating cells. *Hum. Genet.* 35, 57-70 (1976)
- Beek, B., Obe, G.: Differential chromosome radio-sensitivity within the first G₁-phase of the cell cycle of early-dividing human leucocytes in vitro after stimulation with PHA. *Hum. Genet.* 35, 209-218 (1977)
- Beek, B.: Die in vitro-Kultur menschlicher Leukozyten als Testsystem für Chromosomenmutationen. Inaugural-Dissertation, Berlin, 1977
- Bender, M.A., Prescott, D.M.: DNA synthesis and mitosis in cultures of human peripheral lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 29, 221-229 (1962)
- Bender, M.A., Brewen, J.G.: Factors influencing chromosome aberration yields in human peripheral leukocyte system. *Mutat. Res.* 8, 383-399 (1969)
- Bender, M.A., Griggs, G.H., Bedford, J.S.: Mechanisms of chromosomal aberration production. III. Chemicals and ionizing radiation. *Mutat. Res.* 23, 197-212 (1974)
- Bendigkei, H.E., Hanawalt, P.C.: Caffeine inhibition of DNA repair replication in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Proc.*, Abstract G103, p. 36 (1968)
- Benzer, S.: The elementary units of heredity. In: W. D. McElroy and B. Glass (eds.), *The Chemical Basis of Heredity*. John Hopkins Press, Baltimore, 1957
- Benzer, S.: On the topography of the genetic fine structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 47, 403-415 (1961)
- Bianchi, N.O., Bianchi, M.S., Larramendy, M.: Kinetics of human lymphocyte division and chromosomal radiosensitivity. *Mutat. Res.* 63, 317-324 (1979)
- Bianchi, N.O., Bianchi, M.S.: Progress report December 1979. IAEA Conference on the Coordinated Programme on Radiation-Induced Chromosome Aberrations for Genetic Risk Evaluation in Man. Vienna, 1979
- Bianchi, M., Bianchi, N.O., Brewen, J.G., Buckton, K.E., Fabry, L., Fischer, P., Gooch, P.C., Kucerova, M., Léonard, A., Mukherjee, R.N., Mukherjee, U., Nakai, S., Natarajan, A.T., Obe, G., Palitti, F., Pohl-Rüling, J., Schwarzacher, H.G.,

- Scott, D., Sharma, T., Takahashi, E., Tanzarella, C., van Buul, P.P.W.: Evaluation of radidation-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes in vitro. Results of an IAEA-coordinated programme. *Mutat. Res.* 96, 233-242 (1982)
- Bochkov, N.P., Pilosov, R.A.: The effect of gamma rays on human chromosomes. II. The dependence of chromosome aberration frequency upon sex and age. *Genetics (USSR)* 4, 144-153 (1978)
- Boyce, R.P., Howard Flanders, P.: Genetic control of DNA break-down and repair in *E. coli* K-12 treated with mitomycin C or ultraviolet light. *Z. Vererbungs1.* 95, 345-350 (1964)
- Braun, A., Grossman, L.: An endonuclease from *Escherichia coli* that acts preferentially on UV-irradiated DNA and is absent from the *uvrA* and *uvrB* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1838-1842 (1974)
- Braun, A., Hopper, P., Grossman, L.: The *Escherichia coli* UV endonuclease (correndonuclease II). In: P.C. Hanawalt and R.B. Setlow (eds.), *Molecular Mechanisms of Repair of DNA*, Part A., Plenum Press, New York and London, 1975
- Brewen, J.G., Preston, R.J.: Chromosomal interchanges induced by radiation in spermatogonial cells and leucocytes of mouse and Chinese hamster. *Nature (London) New Biol.* 244, 111-113 (1973a)
- Brewen, J.G., Preston, R.J.: The study of reciprocal translocations induced in human spermatogonia by X-rays. *Biology Division Annual Report ORNL*, 4915 period ending June 30 (1973b)
- Brewen, J.G., Preston, R.J., Jones, K.P., Gosslee, D.G.: Genetic hazards of ionizing raidations: Cytogenetic extrapolations from mouse to man. *Mutat. Res.* 17, 245-254 (1973)
- Brewen, J.G., Preston, R.J.: Cytogenetic effects of environmental mutagens in mammalian cells and the extrapolation to man. *Mutat. Res.* 26, 297-305 (1974)
- Bridges, C.B.: Non-disjunction of the sex chromosomes of *Drosophila*., *J. exp. Zool.* 15, 587 (1913)
- Bridges, C.B.: Duplications. *Anat. Rec.* 15, 357 (1919)
- Buckton, K.E., Pike, M.C.: Time in culture, an important variable in studying in vivo radiation-induced chromosome damage in man. *Int. J. Radiat. Biol.* 8, 439-452 (1964).
- Corry, P.M., Cole, A.: Dubble strand rejoining in mammalian DNA. *Nature* 245, 100-101 (1968)

- Darlington, C.D., Upcott, M.B.: The activity of inert chromosomes in *Zea mays*. *J. Genet.* 41, 275 (1941)
- Davidson, J.N.: The Biochemistry of the Nucleic Acids. 7th ed., Chapman and Hall, Science Paperbacks, U. K., pp. 396, 1972
- De Boer, P., van Buul, P.P.W., van Beek, R., van der Hoeven, F., Natarajan, A.T.: Chromosomal radiosensitivity and karyotype in mice using cultured peripheral blood lymphocytes and comparison to this system in man. *Mutat. Res.* 42, 379-394 (1977).
- Debuyst, B., Rosenthal, M., Léonard, A.: Cinétique cellulaire et radiosensibilité des lymphocytes de Chèvre stimulés par la phytohémagglutinine. *C.R. Soc. Biol.* 176, 82-86 (1982)
- Decat, G., Léonard, A., de Meurichy, W.: Anomalies chromosomiques induites par les rayons X dans les lymphocytes du gorille. *C.R. Soc. Biol.* 174, 851-855 (1980).
- Deknuddt, G., Léonard, A.: Ageing and radiosensitivity of human somatic chromosomes. *Expl. Gerontol.* 12, 237-240 (1977)
- Delbrück, M., Stent, G.S.: On the mechanism of DNA replication. In: McElroy, W.D., and B. Glass (eds.), *The Chemical Basis of Heredity*. John Hopkins Press, Baltimore, 1957
- Dertinger, H., Jung, H.: *Molekulare Strahlenbiologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1969
- Dolphin, G.W., Purrott, R.J.: The use of radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes as a dosimeter. In: *Symposium on New Developments in Physical and Biological Radiation Detectors*, IAEA, Vienna (1971)
- Drake, J.W.: *The Molecular Basis of Mutation*. Holden-Day Inc., San Francisco, California, 1970
- Dudin, G., Beek, B., Obe, G.: The human leucocyte test system. I. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 2-day cultures. *Mutat. Res.* 23, 279-281 (1974)
- Dudin, G., Beek, B., Obe, G.: The human leucocyte test system. VIII. DNA synthesis and mitoses in 3-day cultures stimulated with pokeweed mitogen. *Hum. Genet.* 32, 323-237 (1976)
- Dyer, A., Jong, F.K., Ratter, J.A.: Aneuploidy: a redefinition. *Notes Roy. Bot. Garden Edinburgh* 30, 177 (1970)
- Edenberg, H.J., Huberman, J.A.: Eukaryotic chromosome replication. *Annu. Rev. Genet.* 9, 245-284 (1975)
- Epstein, S.S., Bass, W., Arnold, E., Bishop, Y.: The Failure of caffeine to induce mutagenic effects or synergize the effects of known mutagens in mice. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 8, 381-401 (1970)

- Evans, H.J.: Chromosome aberrations induced by ionizing radiations. *Int. Rev. Cytol.* 13, 221-321 (1962)
- Evans H.J., O'Riordan, M.L.: Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mutat. Res.* 31, 135-148 (1975)
- Fabry, L., Léonard, A.: A new approach in the study of the differential radiosensitivities of mammalian chromosomes. *Radiat. Res.* 80, 354-359 (1979)
- Freese, E.: On the molecular explanations of spontaneous and induced mutations. *Brookhaven Symp. Biol.*, pp. 63-75, 1959
- Freifelder, D.: DNA strand breakage by X-irradiation. *Radiat. Res.* 29, 329-338 (1966)
- Gefter, M.L.: DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 45-78 (1975)
- Griffin, C.S., Scott, D., Papworth, D.G.: The influence of DNA content and nuclear volume on the frequency of radiation-induced chromosome aberrations in *Bufo* species. *Chromosoma (Berl.)* 30, 228-249 (1970)
- Grote, S.J., Joshi, G.P., Revel, S.H., Shaw, C.A.: A method for the scrutiny of live mammalian cells in culture and for the measurement of their proliferative ability after X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 39, 377-394 (1981a)
- Grote, S.J., Joshi, G.P., Revel, S.H., Shaw, C.A.: Observation of radiation-induced fragment loss in live mammalian cells in culture, and its effect on colony forming ability. *Int. J. Radiat. Biol.* 39, 395-408 (1981b)
- Haikazyian, E.V., Mikhelson, V.M., Zhestyanikov, V.D.: The mechanisms of action of the inhibitors of cell post-radiation recovery. I. The caffeine inhibition of the rejoining of radiation induced single strand breaks in human lymphocyte DNA. *Tsitologija* 15, 881-887 (1973)
- Ham, R.G.: An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. *Exp. Cell Res.* 29, 515-526 (1963)
- Hannah, A.: Localization and function of heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. *Adv. Genet.* 4, 87-125 (1951)
- Harris, W.J.: The occurrence of two types of synthesis of deoxyribonucleic acid during normal growth in *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* 135, 315-325 (1973)
- Howland, G.P., Hart, R.W., Yette, M.L.: Repair of DNA strand breaks after gamma-irradiation of protoplasts isolated from cultured wild carrot cells. *Mutat. Res.* 27, 81-87 (1975)

- Ikushima, T., Wolff, S.: Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxyuridine- and 5-iododeoxyuridine substituted Chinese hamster chromosomes. *Exp. Cell Res.* 87, 15-19 (1974)
- Kelly, S., Brown, C.D.: Chromosome aberrations as a biological dosimeter. *Am. J. Public Health* 55, 1419-1429 (1965)
- Kihlman, B.A.: Caffeine and Chromosomes. Elsevier Scientific Publishing Comp., Amsterdam, New York, Oxford, 1977
- Kihlman, B.A., Andersson, H.C., Hansson, K., Hartley-Asp, B., Palitti, F.: Formation of chromatid-type aberrations from chemically induced DNA lesions: information obtained with hydroxyurea and caffeine. In: *Environmental Mutagens and Carcinogens (Proceedings of the 3rd International Conference on Environmental Mutagens)*, University of Tokyo Press, Tokyo / Alan R. Liss Inc., pp. 483-493, 1981
- Kihlman, B.A., Hansson, K., Palitti, F., Andersson, H.C., Hartley-Asp, B.: Potentiation of induced chromatid-type aberrations by hydroxyurea and caffeine in G₂. In: A.T. Natarajan, G. Obe and H. Altmann (eds.), *Progress in Mutation Research*, Vol. 4, Elsevier Biomedical Press, pp. 11-23, 1982
- Kihlman, B.A., Hansson, K., Andersson, H.C.: The effects of post-treatments with caffeine during S and G₂ on the frequencies of chromosomal aberrations induced by thiotepa in root tips of *Vicia faba* and in human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.* 104, 323-330 (1982)
- Kornberg, A.: DNA Synthesis. W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1974
- Korenberg, J.R., Freedlender, E.F.: Giemsa technique for the detection of sisterchromatid exchanges. *Chromosoma* 48, 355-360 (1974)
- Kuhlmann, W., Fromme, H.-G., Heege, E.-M., Ostertag, W.: The mutagenic action of caffeine in higher organisms. *Cancer Res.* 28, 2375-2389 (1968)
- Kutlaca, R., Alder, S.J., Seshadri, R.S., Morley, A.A.: Radiation sensitivity of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 94, 125-131 (1982)
- Lang, H.: Der Einfluß von Coffein auf das Schmelzverhalten von DNS. *FEBS Lett.* 18, 27-30 (1971)
- Lang, H.: On the interaction between caffeine and nucleic acids. IV. The influence of caffeine on the photodimerization in DNA. *Stud. Biophys.* 45, 213-221 (1974)
- Lang, H.: Model for repair inhibition by caffeine. *Stud. Biophys.* 50, 145-155 (1975)

- Lea, D.E.: The induction of chromosome structural changes by radiation: detailed quantitative interpretation. *Brit. J. Radiol.*, Suppl. 1, 75-83 (1947)
- Lehmann, A.R., Ormerod, M.G.: Double strand breaks in the DNA of mammalian cells after X-irradiation. *Biochim. Biophys. Acta* 217, 268-277 (1970)
- Lennartz, M., Coquerelle, T., Hagen, U.: Effect of oxygen on DNA strand breaks in irradiated thymocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 24, 621-625 (1973)
- Léonard, A., Gerber, G.B., Papworth, D.G., Decat, G., Léonard, E.D., Deknadt, Gh.: The radiosensitivities of lymphocytes from pig, sheep, goat and cow. *Mutat. Res.* 36, 319-332 (1976)
- Léonard, A., Decat, G., Léonard, E.D., Mortelmans, J.: The chromosomal radiosensitivity of lymphocytes from the chimpanzee (*Pan troglodytes*). *Mutat. Res.* 45, 69-76 (1977a)
- Léonard, A., Gerber, G.B., Decat, G., Léonard, E.D.: The radiosensitivity of chromosomes of rabbit lymphocytes. *Mutat. Res.* 45, 233-231 (1977b)
- Léonard, A., Gerber, G.B.: Nuclear factors influencing chromosome aberration yields in mammalian lymphocytes. In: Conference on Mutations: Their Origin, Nature and Potential Relevance to Genetic Risk in Man. *Zentrallaboratorium für Mutagenitätsprüfung, Freiburg*, pp. 131-150, 1978
- Léonard, A., Fabry, L., Decat, G., Rosenthal, M.: Progress report December 1979. IAEA Conference on the Coordinated Programme on Radiation-Induced Chromosome Aberrations for Genetic Risk Evaluation in Man. Vienna, 1979
- Léonard, A., Decat, G.: Relation between cell cycle and yield of aberrations observed in irradiated human lymphocytes. *Can. J. Genet. Cytol.* 21, 473-478 (1979)
- Léonard, A., Fabry, L., Deknadt, G., Decat, G.: Chromosome aberrations as a measure of mutagenesis: cytogenetic extrapolation from animal to man. *Cytogenet. Cell Genet.* 33, 107-113 (1982)
- Lewin, B.: Sequence organization of eukaryotic DNA: Defining the unit of gene expression. *Cell* 1, 107-111 (1974a)
- Lewin, B.: Gene Expression. Vol. 1 Bacterial Chromosomes. John Wiley and Sons, London, 1974 (b)
- Lewin, B.: Gene Expression. Vol. 2 Eukaryotic Chromosomes. John Wiley and Sons, London, 1974 (c)
- Lima-de-Faria, A.: The chromosome field. I. Prediction of the location of ribosomal cistrons. *Hereditas* 83, 1-22 (1976a)

- Lima-de-Faria, A.: The chromosome field. II. The location of "knobs" in relation to telomeres. *Hereditas* 83, 23-34 (1976b)
- Liniecki, J., Bajerska, A., Karniewicz, W.: The influence of blood oxygenation during in vitro irradiation upon the yield of dicentric chromosomal aberrations in lymphocytes. *Bull. Acad. Pol. Sci.* 21, 69-76 (1973).
- Lohman, P.H.M.: Induction and rejoining of breaks in the deoxyribonucleic acid of human cells irradiated at various phases of the cell cycle. *Mutat. Res.* 6, 449-458 (1968)
- Lyon, M.F., Phillips, R.J.S., Searle, A.G.: A test for mutagenicity of caffeine in mice. *Z. Vererbungs1.* 93, 7-13 (1962)
- Mather, K., Stone, L.H.A.: The effects of X-radiation upon somatic chromosomes. *J. Genet.* 28, 1-24 (1933)
- McClintock, B.: Spontaneous alterations in chromosome size and form in *Zea Mays*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 9, 72-81 (1941)
- McCormick, J.J., Marks, C., Rusch, H.P.: DNA repair after ultraviolet irradiation in synchronous plasmodia of *Physarum polycephalum*. *Biochim. Biophys. Acta* 287, 246-255 (1972)
- McFee, A.F., Banner, M.W.: Behavior of swine leucocytes during in vitro culture. *J. Animal Sci.* 28, 523-530 (1969)
- McFee, A.F., Banner, M.W., Sherrill, M.N.: Influence of animal age on radiation-induced chromosome aberrations in swine leukocytes. *Radiat. Res.* 41, 425-435 (1970)
- Meselson, M., Stahl, F.W.: The replication of DNA in *Escherichia coli*: A classic experiment in molecular biology, showing that DNA replication involves the separation of two complementary polynucleotide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 44, 671-682 (1958)
- Miller, R.C., Aronson, M.M., Nichols, W.W.: Effects of treatment on differential staining of BrdU labeled metaphase chromosomes: three-way differentiation of M3 chromosomes. *Chromosoma* 55, 1-11 (1976)
- Modave, C., Fabry, L., Léonard, A.: Cinétique cellulaire et radiosensibilité des lymphocytes de vache en culture. *C.R. Soc. Biol.* (1982, in press)
- Muller, H.J.: Artificial transmutation of the gene. *Science* 66, 84-87 (1927)
- Murai, Y., Tatsukawa, S., Horikawa, M.: X-ray-induced cell killing and mutations in cultured human cell lines (xeroderma pigmentosum cells and HeLa S3 cells). *Jap. J. Genet.* 54, 415-426 (1979)

- Muramatsu, S., Matsuoka, O.: Comparative studies of radiation-induced chromosome aberrations in several mammalian species. In: Proc. IAEA Symposium on Biological Effects of Low Level Radiation Pertinent to Protection of Man and his Environment. pp. 229-236, Vienna, 1975
- Natarajan, A.T., Gropp, A.: A fluorescence study of heterochromatin and nucleolar organization in the laboratory and tobacco mouse. *Exp. Cell Res.* 14, 245-250 (1972)
- Natarajan, A.T., Obe, G., Dulout, F.N.: The effect of caffeine posttreatment on X-ray-induced chromosomal aberrations in human blood lymphocytes in vitro. *Hum. Genet.* 54, 183-189 (1980)
- Natarajan, A.T., Meijers, M., van Rijn, Z.L.S.: Individual variability of human cells in induction of chromosomal alterations by mutagens. In: M. Sorsa and H. Vainio (eds.) *Mutagens in Our Environment*, Alan Liss Inc. New York, pp 75-88, 1982
- Nomura, M., Benzer, S.: The nature of the "deletion" mutants in rII region of the phage T4. *J. Mol. Biol.* 3, 684-692 (1961)
- Obe, G., Beek, B., Dudin, G.: The human leukocyte test system. V. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 3-day cultures. *Humangenetik* 28, 295-302 (1975)
- Obe, G., Beek, B., Slacik-Erben, R.: The use of the human leukocyte test system for the evaluation of potential mutagens. In: W.A.M. Duncan, B.J. Leonard, M. Brunaud (eds.), *The Prediction of Chronic Toxicity from Short Term Studies*, pp. 118-126, Excerpt Medica/American Elsevier, Amsterdam, 1976a
- Obe, G., Brandt, K., Beek, B.: The human leukocyte test system. IX. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 2-day cultures set up with Eagle's minimal essential medium (MEM). *Hum. Genet.* 33, 263-268 (1976b)
- Painter, T.S., Muller, H.J.: Parallel cytology and genetics of induced translocations and deletions in *Drosophila*. *J. Hered.* 20, 287 (1929)
- Palitti, F., Tanzarella, S., Degraffi F., DeSalvia, R., Fiore, M., Natarajan, A.T.: Formation of chromatid aberrations in G2-stage of cell cycle. *Mutat. Res.* in press, 1983
- Paterson, M.C., Roozen, K.J., Setlow, R.B.: γ -ray-induced chain breaks and alkali-labile bonds in *ldv* DNA of *Escherichia coli* minicells irradiated under aerobic and anoxic conditions. *Int. J. Radiat. Biol.* 23, 495-508 (1973)
- Perry, P., Wolff, S.: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251, 156-158 (1974)

- Regan, J., Trosko, J.E., Carrier, W.L.: Evidence for excision of ultraviolet-induced pyrimidin dimers from DNA of human cells in vitro. *Biophys. J.* 8, 319-325 (1968)
- Revell, S.H.: A new hypothesis for "chromatid" changes. In: Z.M. Bacq and P. Alexander (eds.) *Radiation Biology*, Symp. Liege 1954, pp. 243-253, Butterworth, London, 1955
- Rieger, R.: Die Genommutation (Ploidiemutation). In: H. Stubbe (ed.), *Genetik, Grundlagen, Ergebnisse und Probleme in Einzeldarstellung*, Beitrag 3, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1963
- Rieger, R., Michaelis, A.: Chromosomenmutationen. In: H. Stubbe (ed.), *Genetik, Grundlagen, Ergebnisse und Probleme in Einzeldarstellung*, Beitrag 6, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1967
- Rieger, R., Michaelis, A., Green, M.M.: *Glossary of Genetics and Cytogenetics*, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1976
- Röhrborn, G.: Mutagenitätsuntersuchungen an Mäusen nach chronischer Behandlung mit Coffein. In: G. Czok und K. Lang (eds.), *Physiologische, Pharmakologische und Klinische Wirkungen des Kaffees*. *Z. Ernährungswiss. Suppl.* 14, 54-67 (1972)
- Rupp, W.D., Zipser, E., von Essen, C., Reno, D., Prosnitz, L., Howard-Flanders, P.: Repair and reconstruction of chromosomal DNA after replication. In: V.P. Bond, H.D. Suit and V. Marcial (eds.), *Conference on Time and Dose Relationship in Radiation Biology as Applied to Radiotherapy*, Carmel, California, September 15 - 18, 1969, pp. 1-13
- Sankaranarayanan, K.: Evaluation and re-evaluation of radiation hazards in man. II. The arm number hypothesis and the induction of reciprocal translocations in man. *Mutat. Res.* 35, 371-386 (1976a)
- Sasaki, M.S., Tonomura, A., Matsubara, S.: Chromosome constitution and its bearing on the chromosomal radiosensitivity in man. *Mutat. Res.* 10, 617-633 (1970)
- Sax, K.: Analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. *Genetics* 25, 41-68 (1940)
- Sax, K.: Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by X-rays. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 9, 93-101 (1941)
- Schvartzman, J.B., Gutierrez, C.: The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of damaging treatment in provoking the formation of sister-chromatid exchanges. *Mutat. Res.* 72, 483-489 (1980)

- Scott, D., Bigger, T.R.L.: The relative radiosensitivities of human, rabbit and rat-kangaroo chromosomes. *Chromosoma* 49, 185-203 (1974)
- Setlow, R., Carrier, W.: The disappearance of thymidine dimers from DNA, an error-correcting mechanism. *Nature (Lond.)* 197, 226 (1964)
- Setlow, R.B., Setlow, J.K.: Effects of radiation on polynucleotids. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1, 293-346 (1972)
- Stadler, L.J.: Mutations in barley induced by X-rays and radium. *Science* 68, 186 (1928)
- Stadler, L.J.: On the genetic nature of induced mutations in plants. *Proc. 4th Int. Congr. Genetics* 1, 274-294 (1932)
- Steffen, J., Michailowski, A.: Heterogenous chromosomal radiosensitivity of phytohaemagglutinin-stimulated human blood lymphocytes in culture. *Mutat. Res.* 17, 367-376 (1973)
- Stent, G.S.: *Molecular Genetics. An Introductory Narrative.* W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1971
- Strasburger, E.: Chromosomenzahl. *Flora* 100, 398 (1910)
- Sturtevant, A.H.: The effects of unequal crossing over at the Bar locus in *Drosophila*. *Genetics* 10, 117-147 (1925)
- Stephan, G., Adler, I.-D., Schwartz-Porsche, D., Hollihn, K.-U., Obe, G.: Characterization of feline whole blood cultures and determination of the frequency of radiation-induced dicentric in human and feline lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 35, 351-359 (1979)
- Täckholm, G.: Zytogenetische Studien über die Gattung *Rosa*. *Acta Hort. Ber.* 7 (1922)
- Takahashi, E., Hirai, M., Tobari, I., Utsugi, T., Nakai, S.: Radiation-induced chromosome aberrations in lymphocytes from man and crab-eating monkey. The dose-response relationships at low doses. *Mutat. Res.* 94, 115-123 (1982)
- Taylor, J.H.: The time and mode of duplication of chromosomes. *Amer. Nat.* 91, 209-222 (1957)
- Trepel, F.: Das lymphatische Zellsystem: Struktur, allgemeine Physiologie und allgemeine Pathophysiologie. In: H. Begemann (ed.) *Blut und Blutkrankheiten*, 5. Auflage, pp 1-191, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1976
- Trosko, J.F., Chu, E.H.Y.: Inhibition of repair of UV-damaged DNA by caffeine and mutation induction in Chinese hamster cells. *Cell.-Biol. Interact.* 6, 317-332 (1973)

- Trosko, J.F., Wilder, K.: Repair of UV-induced pyrimidine dimers in *Drosophila melanogaster* cells in vitro. *Genetics* 73, 297-302 (1973)
- Van Buul, P.P.W., De Boer, P., Zwanenburg, S. Richardson, J.F.: Comparison of the chromosomal radiosensitivity of blood lymphocytes and stem cell spermatogonia in the rhesus monkey and the mouse. *Mutat. Res.* 73, 221-226 (1979)
- Van der Schans, G.P., Bleichrodt, J.F., Blok, J.: Contribution of various types of damage to inactivation of biologically active double stranded circular DNA by gamma-radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 23, 133-150 (1973)
- Veatch, W., Okada, S.: Radiation-induced breaks of DNA in cultured mammalian cells. *Biophys. J.* 9, 330-346 (1969)
- Watson, J.D., Crick, F.H.C.: Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738 (1953)
- Watson, J.D.: *Molecular Biology of the Gene*. W.A. Benjamin, New York, 1965
- Winkler, H.: Über die experimentelle Erzeugung von Pflanzen mit abweichenden Chromosomenzahlen. *Z. Bot.* 8, 417 (1916)
- Wolff, S.: Mechanisms in radiobiology. In: M. Errera, and A. Fossberg (eds.), *Radiation genetics*, Vol. 1, Academic Press, New York, pp. 410-475, 1961
- Wolstenholme, G.E.W.: *Mutation as cellular process*. J. and A. Churchill, London, 1969
- Wyszynska, K., Liniecki, J.: The yield of radiation-induced chromosomal aberrations in lymphocytes as related to the time of arrival at first poststimulation mitosis. *Mutat. Res.* 73, 101-114 (1980)

ABSCHLUSSBEMERKUNG

Die Versuche zu vorliegender Arbeit habe ich selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der darin angegebenen Hilfsmittel durchgeführt.

Zur Durchführung meiner Doktorarbeit hat mir die Kommission der Europäischen Gemeinschaften dankenswerterweise ein Stipendium für die Dauer von drei Jahren gewährt.

Während dieser Zeit arbeitete ich im Labor für Genetik der Abteilung für Strahlenbiologie des Centre d'Etude de l'Energie Nucleaire in Mol, Belgien. Ich danke der Abteilungsleitung für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und der erforderlichen Sachmittel. Insbesondere danke ich dem Leiter des Labors für Genetik, Herrn Professor Dr. Alain Léonard für seine Unterstützung und Anteilnahme an meiner Arbeit. Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Labors für ihre Kollegialität und Hilfsbereitschaft. Herrn Professor Dr. Dr. George B. Gerber danke ich für seine großen Bemühungen, mir bei der Aufbereitung und Verarbeitung der Versuchsergebnisse und ihrer Darstellung behilflich gewesen zu sein, sowie für seine Anleitung bei der elektronischen Textverarbeitung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Günter Obe für die Überlassung des Themas, für sein ständiges Interesse an meiner Arbeit, für seine wertvolle Kritik und seine häufige Diskussionsbereitschaft.

LEBENS LAUF

Am 24. August 1948 wurde ich als Sohn des Alexander Rosenthal und seiner Ehefrau Margarete in Niederschelden, Kreis Siegen geboren. Ich bin seit 1972 verheiratet und habe zwei Kinder.

Nach dem Volksschulabschluß im Jahr 1963 absolvierte ich eine Lehre als Großhandelskaufmann und arbeitete danach in meinem erlernten Beruf.

Von 1969 bis 1971 besuchte ich das Westfalen-Kolleg in Dortmund, wo ich die Hochschulreife erlangte.

Im Sommersemester 1971 begann ich mein Biologie-Studium an der Freien Universität in Berlin. Die Vordiplomprüfung legte ich im Wintersemester 1973 ab.

Von April 1976 bis März 1979 arbeitete ich als studentischer Tutor am Institut für Genetik der FU-Berlin. Während dieser Zeit entstand meine Diplomarbeit. Mein Diplom wurde mir im November 1978 zuerkannt, womit mein Studium an der FU-Berlin beendet war.

Zwischen Juni 1979 und Mai 1982 arbeitete ich als Stipendiat der Kommission der Europäischen Gemeinschaften am Département de Radiobiologie des Centre d'Etude de l'Energie Nucleaire in Mol, Belgien, wo ich die vorliegende Arbeit durchgeführt habe.

Von Juni bis November 1982 war ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in München beschäftigt.

